

La synthèse biologique de la glutamine

INAUGURAL-DISSERTATION

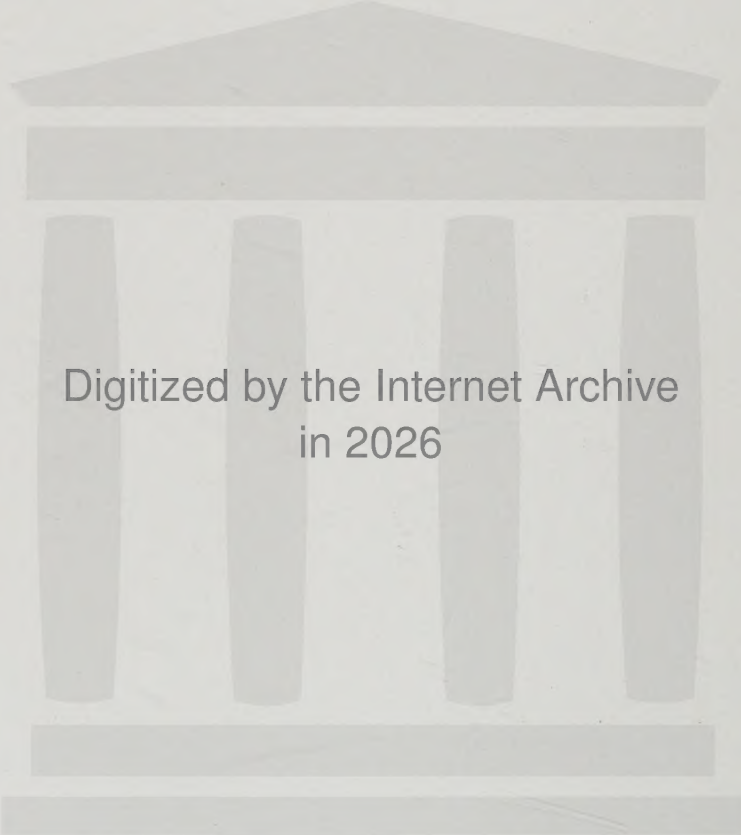
**ZUR ERLANGUNG DER
PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE
VORGELEGT DER
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
DER
UNIVERSITÄT ZÜRICH
VON**

JÖRG FREI

**Dipl. Ing. Chem. E. T. H.
AUS HEDINGEN (ZÜRICH)**

**BEGUTACHTET VON DEN HERREN
PROF. DR. F. LEUTHARDT UND PROF. DR. P. KARRER**

**ZÜRICH 1954
BRUNNER & BODMER**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507224_0080

La synthèse biologique de la glutamine

INAUGURAL-DISSERTATION

**ZUR ERLANGUNG DER
PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE
VORGELEGT DER
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II**

**DER
UNIVERSITÄT ZÜRICH**

VON

JÖRG FREI

**Dipl. Ing. Chem. E.T.H.
AUS HEDINGEN (ZÜRICH)**

**BEGUTACHTET VON DEN HERREN
PROF. DR. F. LEUTHARDT UND PROF. DR. P. KARRER**

**ZÜRICH 1954
BRUNNER & BODMER**



" A la mémoire de mon père "

" Les recherches concernant la présente thèse ont été faites sous la direction de Monsieur le Professeur F. Leuthardt, dans les laboratoires de l'Institut de Chimie Physiologique de l'Université de Zurich.

Que Monsieur le Professeur F. Leuthardt veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour son appui qui m'a été si précieux. "

TABLE DES MATIERES

PARTIE THEORIQUE

I.	Découverte et présence de la glutamine	7
II.	Importance physiologique de la glutamine	7
III.	Synthèse biologique de la glutamine	8
IV.	Conditions requises pour la synthèse biologique de la glutamine	9

PARTIE EXPERIMENTALE

I.	Matériel	13
II.	Méthodes analytiques	14
III.	Résultats	
1.	Localisation de la synthèse enzymatique de la glutamine dans la cellule animale	16
2.	Mécanisme de la formation biologique de la glutamine en système complet	28
3.	Preuve de la formation biologique de la glutamine par la chromatographie sur papier	34
4.	Fractionnement d'extraits de matière grise de cerveau de mouton ou de veau	37
5.	Inhibiteurs et action de divers facteurs dans des systèmes purifiés, sans mitochondries	47
6.	Ammonium remplacé par d'autres bases	49

CONCLUSIONS	54
-------------	----

BIBLIOGRAPHIE	56
---------------	----

PARTIE THEORIQUE

I. DECOUVERTE ET PRESENCE DE LA GLUTAMINE

Ce n'est que soixante-dix-sept ans après la découverte de l'asparagine par Vauquelin et Robiquet (95) (1806) que Schulze et Bosshard (83) isolèrent pour la première fois, à partir de germes de courges, l'amide de l'acide glutamique, la glutamine, et l'identifièrent comme tel.

La glutamine accompagne l'acide glutamique dans quasi tous les tissus animaux. Harris (37), Hamilton (35), Archibald (2) et Prescott et Waelsch (77) en déterminèrent la teneur dans le plasma sanguin. Krebs (46), par une méthode microbiologique beaucoup plus précise, trouva que l'acide glutamique (3,41 mg %) plus la glutamine (5,78 mg %) représentent environ le tiers de l'azote aminé total du plasma. Archibald (2) obtient des valeurs diminuées dans le cas de certaines maladies telles que la malaria, les néphrites, etc. ... Dans les tissus, la quantité d'acide glutamique et de glutamine varie beaucoup d'un organe à l'autre (de presque 0 à 14 mg %), l'acide étant en général présent en plus grande quantité que l'amide (3).

II. IMPORTANCE PHYSIOLOGIQUE DE LA GLUTAMINE

A l'encontre de l'urée, inerte pour l'organisme des animaux supérieurs, la glutamine (ainsi que l'asparagine), en tant qu'amide, représente un porteur idéal d'ammonium labile, non toxique. On rencontre cet amide participant à de nombreuses réactions biologiques ; on peut le comparer à un carrefour du métabolisme intermédiaire. De par sa structure même, la glutamine est en relation avec le métabolisme de l'azote, le métabolisme des lipides et le métabolisme glucidique. Sa fonction amide la fait intervenir dans l'uréogénèse, dans la formation de la citrulline (Leuthardt et coll. (59)), étape obligatoire dans cette genèse. Leuthardt et Glasson (54, 55) dans des résultats confirmés par Schoenheimer et coll. (82), Krebs (44), et Gornall et Hunter (30), montrent que la glutamine est, avec l'ammonium, la meilleure source de ce dernier dans la formation de l'urée. Van Slyke et coll. (94) admettent la glutamine comme

étant le précurseur de l'ammonium urinaire. On trouve plusieurs glutaminases réparties dans des fractions cytologiques différentes et dans divers organes (Archibald (4), Krebs (43), Waelsch et coll. (69, 98, 99, 100, 101), Greenstein (33, 34) et Errera (22, 23)). Par l'hydrolyse enzymatique (glutaminase) en acide glutamique, et par transamination, ce dernier donnant de l'acide α -cétoglutarique (Braunstein et Kritzman (11, 12)), la glutamine est en relation avec le cycle tricarboxylique (Hunter et Leloir (40)). La glutamine participe en outre à la désintoxication de l'acide benzoïque et de l'acide phénylacétique en formant respectivement l'acide hippurique et la phénylacétyl-glutamine (Thierfelder et Sherwin (91), Leuthardt et coll. (28, 50, 52, 53, 54, 55, 71)). Selon Krebs et coll. (74) la formation d'hypoxanthine serait accélérée en présence de glutamine. D'après Tigerman et MacVicar (93) la glutamine constituerait une réserve d'ammonium dans les tissus, incorporée ou non à des protéines ; il est d'ailleurs connu depuis longtemps que la glutamine est la forme sous laquelle l'acide glutamique est lié aux protéines.

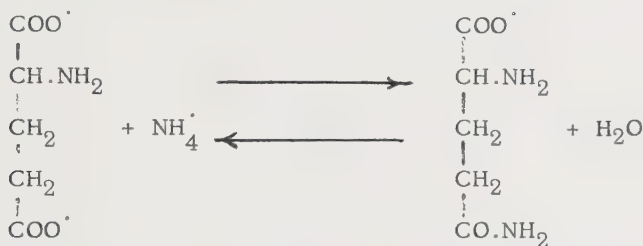
III. SYNTHÈSE BIOLOGIQUE DE LA GLUTAMINE

Krebs (43), en 1935, constata, en faisant incuber en présence de coupes d'organes, de l'acide glutamique et des ions ammonium, la disparition partielle de ces derniers et conclut de ce fait à la formation de glutamine. Il observa cette synthèse dans la rétine, dans des coupes de reins et de cerveaux de mammifères et de quelques animaux d'autres classes (cobaye, porc, rat, mouton, pigeon, gallinacés, grenouille, tortue, truite, etc.), tandis qu'Oerström et coll. (74) la décelèrent dans des coupes de foie de pigeon. Les coupes de foie de mammifères restèrent inactives. Leuthardt et Bujard (56), par contre, sont parvenus à démontrer la formation de cet amide dans le foie de rat, en remplaçant les coupes par le tissu homogénéisé, soulignant ainsi en même temps la possibilité de cette synthèse biologique avec des cellules détruites. Speck (86, 87) indépendamment des deux derniers auteurs, obtint les mêmes résultats avec le foie de pigeon homogénéisé. Cette différence d'activité entre les coupes et l'homogénat de foie de mammifères est certainement due à une question de diffusion : l'acide glutamique, comme tous les acides dicarboxyliques, ne diffuse que très lentement dans les cellules (Leuthardt (51)), ralentissant ainsi considérablement la formation de glutamine. Un cas analogue est présenté par la réaction de Borsook et Dubnoff (10) (synthèse de l'arginine à partir de citrulline et d'acide glutamique), laquelle n'est également pas observée dans les tissus intacts (Krebs (44)). Elliot (19, 20) et Speck (88), en travaillant dans des conditions

déterminées, furent les premiers à montrer la synthèse biologique de la glutamine avec des extraits de poudres acétoniques, respectivement de matière grise de cerveau de mouton et de foie de pigeon. Elliot (21) a purifié dernièrement un enzyme synthétisant la glutamine dans les mêmes conditions à partir d'une graine végétale.

IV. CONDITIONS REQUISES POUR LA SYNTHESE BIOLOGIQUE DE LA GLUTAMINE

On peut formuler théoriquement la formation de la glutamine selon la réaction :



Or il est connu que la formation d'un amide à partir de l'acide correspondant est une réaction endergonique, c'est à dire dont l'équilibre est très fortement déplacé en faveur de l'hydrolyse. Pour que la réaction synthétisante puisse avoir lieu, il faut qu'elle soit accompagnée d'une réaction ou série de réactions exergoniques (oxydation, transphosphorylations, etc.), permettant la formation d'un ou de plusieurs corps intermédiaires, plus instables que le produit final, c'est à dire plus riches en énergie libre. En effet, soit avec les coupes, soit avec les tissus homogénéisés, la présence de l'oxygène de l'air est nécessaire ; Krebs (43) et Speck (86, 87) ont montré qu'aucune synthèse de la glutamine n'a lieu dans des conditions strictement anaérobiques pour les coupes ou les homogénats, hormis pour la rétine, celle-ci n'ayant qu'une faible respiration (il est de toute évidence que dans ce dernier cas un apport d'énergie est tout de même requis). Nous verrons dans le présent travail que les inhibiteurs de la respiration ou de la "cyclophorase" étudiés, diminuent également la synthèse de la glutamine, soit avec des tissus homogénéisés, soit avec un système analogue.

Les milieux d'incubation employés par les auteurs cités varient selon des conditions déterminées par les animaux et les organes utilisés, mais sont identiques dans les grandes lignes. Certains sels, tels que ClNa , ClK , SO_4Mg , phosphates inorganiques (tampons), se retrouvent dans tous les cas, le pH optimum

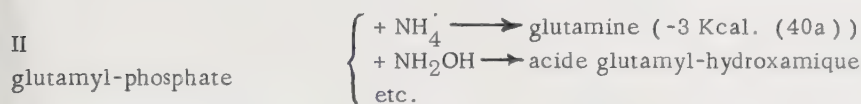
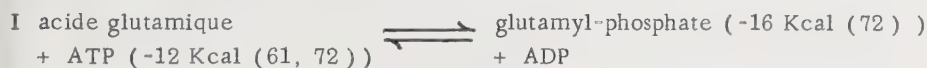
étant partout voisin de 7. Leuthardt et Bujard (56) établissent la nécessité de la présence de triphosphate d'adénosine (ATP), bien qu'en petite quantité, dans les expériences avec homogénat de foie de rat; Speck (86, 87), par contre, pour le foie homogénéisé de pigeon, ne l'estime pas indispensable, mais il renforce son milieu avec du cytochrome c, de la cozymase et du citrate; Krebs (43) et Oerström (73), travaillant avec des coupes, n'ajoutent à leur milieu, en plus de l'ammonium et du glutamate, que les sels déjà mentionnés et du glucose comme substrat d'oxydation. Le substrat d'oxydation de Leuthardt et Bujard (56) n'est rien d'autre que l'acide glutamique (Still, Buell et Green (89)), celui-ci pouvant se transformer réversiblement par transamination en acide α -céto glutarique (Braunstein et Kritzmman (11, 12)), et ce dernier comme le citrate de Speck (86, 87), est utilisé dans le cycle tricarboxylique; Leuthardt et Bujard (57) ont obtenu une synthèse de la glutamine avec du foie homogénéisé en remplaçant le glutamate par l' α -céto glutarate. Elliot (19, 20) et Speck (88), en prenant des extraits de poudres acétoniques, n'obtiennent dans ce cas une synthèse qu'en ajoutant au système une assez forte quantité d'ATP, mais arrivent alors à une relation stoechiométrique entre la glutamine formée et le phosphate inorganique provenant du triphosphate d'adénosine, avec des préparations d'enzyme dépourvues d'adénosine triphosphatase. Nous confirmerons ces résultats dans le présent travail (voir aussi communication préliminaire (27)). La formation de glutamine ne nécessite alors plus la présence d'oxygène.

Nous avons vu dans un travail antérieur (26) qu'en centrifugeant un homogénat de foie de rat actif, les diverses fractions prises séparément, soit le surnageant, le résidu ou les mitochondries, perdent considérablement de leur activité; que, par contre, si on réunit à nouveau surnageant et résidu on retrouve l'activité première de l'homogénat. Ceci nous a incité, comme nous le montrerons plus loin, à faire agir simultanément sur les substrats le surnageant et les mitochondries, et nous trouvons également dans ce cas une activité de beaucoup supérieure à la somme des activités des fractions prises séparément.

En remplaçant l'ammonium par l'hydroxylamine, (Speck (88), Elliot (19, 20)) et nous mêmes avons pu montrer, avec des extraits de poudres acétoniques, la formation d'acide glutamyl-hydroxamique, en dosant celui-ci colorimétriquement selon la méthode de Lipmann et Tuttle (62) pour les acyl-phosphates.

D'après tout ce que nous venons de dire, on peut admettre la formation intermédiaire de glutamyl-phosphate, quoique ce produit n'ait pu être isolé, vu l'instabilité de ce genre de composé en présence d'ammonium ou d'hydroxylamine, et sa non-synthèse en l'absence de ces derniers (Speck 88), Elliot (19, 20); ces bases, en utilisant l'acyl-phosphate (équation II) déplacent constamment

l'équilibre en faveur de la formation de ce dernier (équation I). Comme nous le verrons plus loin, d'autres bases peuvent également réagir avec le glutamyl-phosphate dans nos conditions d'expérience : la guanidine, l'agmatine, l'ester éthylique de la glycine ; nous avons dans ce dernier cas formation d'un γ -dipeptide. Certains peptides semblent encore réagir, quoique très faiblement. Speck (88) obtient les mêmes résultats avec la méthylamine et l'hydrazine. D'autres bases et acides aminés basiques, tels que l'ornithine, l'histidine, l'histamine, l'arginine et la glycocyamine ne réagissent pas, tout au moins dans nos conditions d'expérience. Il en ressort la présence nécessaire de l'ATP, devant fournir l'"energy-rich phosphate bond" de Lipmann (61). On peut donc considérer la formulation suivante :



Les énergies entre parenthèses représentent les énergies libres des groupes labiles des composés auxquels elles se rapportent et qui entrent en réaction (pour l'ATP seulement le premier phosphate labile).

On pourrait évidemment considérer qu'une molécule d'ATP, ayant deux phosphates labiles, puissent réagir avec deux molécules d'acide glutamique pour former deux molécules de glutamyl-phosphate et une d'acide adénylique ; or, tel n'est pas le cas, comme le montrent les expériences de Speck (88) et d'Elliot (19, 20) : L'ADP seul ne livre pas de glutamine et additionné à l'ATP il inhibe compétitivement la réaction.

Dans les systèmes de synthèse biologique de la glutamine, tels que les coupes, les tissus homogénéisés, le surnageant additionné de mitochondries, n'ayant besoin que de très peu d'ATP, il faut en admettre la resynthèse continuelle. Or nous savons que les mitochondries sont le siège d'une considérable activité métabolique. Schneider (80, 81) et Hogeboom et coll. (38, 39) ont trouvé que d'importants ferments respiratoires, tels que la succinodéshydrogène oxydase et le cytochrome c, ainsi qu'une ATP'ase, sont accumulés dans ces granules. En outre d'après les travaux de Green et coll. (31) on peut déduire que le système de la "cyclophorase" (système enzymatique du cycle tricarboxylique) réside dans les mitochondries. Leuthardt et Mauron (60), en localisant l'oxydation du pyruvate, de l' α -cétoglutarate, du succinate, du fumarate et du citrate dans des suspensions de mitochondries de foie et de rein de rat, arrivent

aux mêmes conclusions. Ces faits sont confirmés par Lehninger et coll. (41, 48), lesquels affirment que les mitochondries sont responsables de l'oxydation des acides gras.

On trouve en outre que les synthèses biologiques de la citrulline (Leuthardt et Müller (58, 59, 65, 66, 67)) et de l'acide hippurique (Nielsen et Leuthardt (71)) sont localisés dans ces granules. Une transaminase (acide glutamique $\rightleftharpoons$ acide oxalylacétique) très active a également été décelée dans les mitochondries (Leuthardt et Müller (68)).

D'autre part Leuthardt et Müller (66) et Potter et Schneider (76) ont également établi que la phosphorylation oxydative de l'acide adénylique (AMP) en ATP a lieu dans les mitochondries en présence de pyruvate, d' α -cétoglutarate, de fumarate ou de glutamate. D'après les travaux de Cross et coll. (16), stipulant que l'estérification de phosphate inorganique accompagne toutes les étapes oxydatives catalysées par la cyclophorase, on peut admettre que cette dernière est en étroite relation avec la phosphorylation de l'AMP. Quelques expériences d'inhibition dans le présent travail renforceront cette hypothèse. L'AMP ou l'ADP pourraient être des accepteurs de groupes phosphoryls labiles provenant de l'oxydation du pyruvate (Lipmann (64)). D'après l'interprétation de Lehninger et coll. (6), seul l'ADP (et non l'AMP) est phosphorylé oxydativement en ATP, et par l'action d'une myokinase présente dans les mitochondries, l'AMP et l'ATP reforment de l'ADP qui lui est rephosphorylé oxydativement en ATP et ainsi de suite. La faible quantité d'ATP ou d'ADP toujours présent dès le début dans le système, suffit donc pour élever l'AMP à un niveau énergétique plus élevé. Rappelons que les myokinases catalysent la réaction réaction réversible suivante :



On peut donc concevoir que les mitochondries collaborent plus ou moins étroitement à toutes les réactions nécessitant la présence de l'ATP, en resynthétisant ce dernier au fur et à mesure de son utilisation, peu importe si ces enzymes d'anabolisme sont extérieurs à ces granules (synthèse de la glutamine et d'autres ferments solubles du cytoplasme) ou liés à leur structure (synthèse de la citrulline, de l'acide hippurique, etc.).

D'après tout ce que nous venons de constater, les ferments (glutaminases) catalysant l'hydrolyse de la glutamine (diminution de l'énergie libre due au groupe amide) ne sont pas identiques avec le ou les enzymes synthétisant l'amide (augmentation de l'énergie libre), lesquels sont des transphosphorylases (phosphorylation de l'acide glutamique par l'ATP).

PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL

Animaux : Les rats utilisés étaient des albinos, qui avaient reçu une nourriture permettant des conditions d'expérience optimales. Ces animaux assomés étaient à jeun de quarante huit heures environ. Les organes, foie ou reins, prélevés immédiatement après la mort de l'animal, furent refroidis dans de la glace. Les cobayes, employés plus rarement, ne furent pas soumis à un régime spécial.

Cerveaux ou foie de ruminants (veau, mouton, porc) : Ces organes mis le plus rapidement possible à la glace après la mort de l'animal furent préparés sitôt leur arrivée au laboratoire.

Tissus homogénéisés (homogénats) : L'homogénéisation fut exécutée à 0° à l'aide de l'appareil de Potter et Elvehjem (75) ou dans un appareil "Turmix" pour de plus grandes quantités, soit dans le milieu de Lehninger (47) sans magnésium, soit dans du ClK isotonique (11,5 ‰). Les concentrations du tissu homogénéisé dans le milieu varient selon les expériences de 10 à 33 ‰. L'homogénat est ensuite filtré à travers une gaze pour éliminer les débris de tissus conjonctifs, puis conservé au froid.

Mitochondries : Celles-ci furent obtenues dans du ClK isotonique et du mannitol, à partir d'homogénat, à la suite d'une série de centrifugations fractionnées selon la méthode mise au point par Leuthardt et Müller (58). Dans nos essais les mitochondries furent reprises dans un volume de mannitol équivalent à 1/3 du surnageant provenant de la centrifugation initiale.

Poudres acétoniques et alcooliques : Leurs préparations seront décrites plus loin.

Produits et substrats : Les substances employées furent toutes choisies les plus pures possible et de préférence de qualité pour l'analyse. Le triphosphate d'adénosine fut isolé de muscles de lapins selon les méthodes combinées de Needham (70), Kerr (42), Le Page (49), Dounce (18) et Bielschowsky (9). Le diphosphate d'adénosine (ADP) fut préparé par action de la myosine sur

l' ATP, selon Bailey (7), ou par hydrolyse du même produit à p_H 4,5, à 100°, pendant 60 minutes selon Bielschowsky (9). La pureté de l' ADP ou de l' ATP a été déterminée par des dosages de phosphate (labile et total) d' une part, et par chromatographie (sur papier ou sur colonne "Dowex" selon Cohn et Carter (15)) d' autre part. L' acide adénosine de muscle (5-phosphorique) (AMP) nous a été fourni par la maison Ernst Bischoff (Ivoryton, Connecticut). La glutamine fut extraite des betteraves d' après le procédé de Vickery et coll. (95).

Milieu d' incubation : L' isotonicité du milieu, pour les expériences avec homogénats et suspensions de mitochondries, fut ajustée par rapport au sang (environ 310 μ -osmoles / cm^3) à l' aide d' une solution de CNa-ClK (le rapport de ces deux sels étant le même que dans le milieu de Lehninger (47)). La composition exacte du milieu, ainsi que le p_H , seront indiqués pour chaque expérience.

Tampons : Pour les systèmes à phosphorylation oxydative (c' est à dire avec resynthèse de l' ATP), nous avons utilisé un tampon phosphate, lequel est en même temps donateur de phosphate inorganique. Pour les expériences ne dépendant que de la quantité d' ATP présent nous avons employé des tampons au véronal (Michaelis) ou au tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane (2-amino-2-méthyl-1,3-propane-diol) de Gomori (29), biologiquement indifférents.

Incubation : Les essais, sauf indications contraires, furent secoués à l' air pendant 30 minutes et à 38°.

Défécation : La réaction fut arrêtée, soit par déprotéinisation au bain-marie pendant 30 secondes pour les expériences avec dosage de glutamine, soit avec de l' acide trichloracétique pour les dosages de phosphate ou d' acide glutamyl-hydroxamique.

II. METHODES ANALYTIQUES

Dosage de l' activité enzymatique : La détermination de la glutamine est basée, dans toutes les méthodes, sur l' hydrolyse du groupe amide et du dosage ultérieur de l' ammonium libéré. Après défécation au bain-marie avec éventuel abaissement du p_H et centrifugation, nous avons utilisé l' une des trois méthodes suivantes avec, dans tous les cas, détermination de l' ammonium selon Sobel et coll. (85) :

a) adsorption de l'ammonium en excès avec de la permutite, et hydrolyse à p_H 6,5 et à 100° , pendant deux heures selon Leuthardt et Bujard (56) et Vickery et coll. (97). Le désavantage de cette méthode est que la permutite adsorbe également une partie de la glutamine formée.

b) dosage de l'ammonium avant et après l'hydrolyse à p_H 6,5 et à 100° , pendant deux heures; la différence correspond à la quantité de glutamine formée. L'asparagine est à peine desamidée dans ces conditions.

c) dosage de la glutamine à l'aide de *Clostridium Welchii* SR 12 selon Krebs (45) et Frei et Leuthardt (26). Cette bactérie possède une glutaminase spécifique, hydrolysant le groupe amide de la glutamine naturelle en présence de "Cétavlon" (bromure de cétyle-triméthyle-ammonium). Nous avons vérifié cette spécificité dans le seul cas pouvant nous intéresser, celui de l'asparagine :

<u>Amide</u>	<u>% Désamidation</u>
Glutamine	95
Asparagine	0

Par dosage de l'ammonium avant et après incubation avec *Cl. Welchii*, nous obtenons par différence la quantité de glutamine formée. Pour certaines expériences de routine nous avons employé, afin de doser l'activité de notre enzyme, la méthode plus rapide de Speck (88) consistant à faire incuber de l'hydroxylamine à la place d'ammonium et à doser selon Lipmann et Tuttle (62) l'acide glutamyl-hydroxamique formé. Cette méthode n'est utilisable que pour les systèmes indépendants de la cyclophorase.

Le phosphate inorganique, provenant de l'ATP et libéré pendant la synthèse biologique de la glutamine, a été dosé selon Fiske et Subbarow (24) ou selon Berenblum et Chain (8).

Détermination des protéines :

a) L'azote protéique fut dosé selon la méthode usuelle du micro-Kjeldahl avec distillation directe dans l'acide borique.

b) Dosage colorimétrique de la tyrosine contenue dans les protéines selon Folin et Ciocalteu (25). Cette réaction, basée sur la présence des groupements phénols dus à la tyrosine des protéines, a les avantages suivants sur la méthode précédente : plus rapide, plus précise pour de petites quantités de protéines, de ce fait moins de solution d'enzyme utilisée, et plus agréable en cas de fractionnement au sulfate d'ammonium. Ce dosage n'est évidemment utilisable que si on peut admettre constant le rapport tyrosine : protéine, ce qui n'est malheureusement pas toujours le cas. Nous n'emploierons cette méthode que pour des dosages

de routine. Nous avons adapté cette méthode, développée primitivement par ses auteurs pour un colorimètre, au spectrophotomètre de Beckman. Les lectures furent faites à une longueur d'onde de 500 $m\mu$, les valeurs étant linéaires jusqu'à 25 γ de tyrosine par cm^3 .

III. RESULTATS

1. Localisation de la synthèse enzymatique de la glutamine dans la cellule animale.

Choix des animaux et des organes.

Pour les expériences courantes nous eûmes à choisir entre le cobaye et le rat; le foie de ce dernier se trouva être le plus actif (tableau I).

TABLEAU I

Comparaison entre les activités de foies et reins de rat et cobaye. - Dans tous les essais : $ClNH_4$ 0,008 m, acide glutamique 0,026 m, ATP 0,001 m, SO_4Mg 0,0026 m ; homogénat dans ClK isotonique ; p_H 6,8, tampon phosphate 0,0054 m. Incubation 30 minutes à 38°.

Animal	Organe	Homogénat		Glutamine formée $\mu m/cm^3$ essai
		cm^3/cm^3 essai	% ds. ClK	
Cobaye	foie	0,25	12,5	1,23
Cobaye	foie	0,25	20,0	0,13
		0,375	20,0	0,5
Rat	foie	0,125	25,0	5,5
		0,05	25,0	2,7
Rat	foie	0,25	12,5	6,0
Rat	foie	0,25	12,5	3,5
	rein	0,25	12,5	3,2
Cobaye	rein	0,1	33,3	1,5 *
	foie	0,1	33,3	0,8 *

* Détermination selon l'ancienne méthode de Leuthardt et Bujard (56). Tous les autres dosages de glutamine seront faits selon la méthode au Cl. Welch SR 12 (Frei et Leuthardt (26)).

Les foies homogénéisés de porc, de veau et de mouton furent trouvés très peu actifs dans les conditions d'expérience, entre 0,5 et 1,5 μ m de glutamine formée par cm³ d'essai. Nous parlerons plus loin des extraits, très actifs, de poudres acétoniques de cerveaux de mouton et de veau.

Fractionnement de l'homogénat

Dans le but de localiser dans la cellule hépatique l'enzyme synthétisant la glutamine, nous avons soumis l'homogénat à diverses centrifugations. La séparation en surnageant et résidu après centrifugation à 1500 g, à 0° environ, pendant 15 minutes, nous montre une perte d'activité pour les dites fractions prises séparément, activité que l'on retrouve intégralement si on resuspend le résidu dans le surnageant (ou si on les ajoute séparément). L'action mécanique de la centrifugation n'a donc pas d'effet sur nos systèmes enzymatiques. Pour les expériences nous avons resuspendu le résidu dans un volume de ClK isotonique égal au volume du surnageant (tableau II).

TABLEAU II

Centrifugation de l'homogénat. (25 % dans ClK isotonique) pendant 15 min. à 1500 g. - Dans tous les essais : 0,125 cm³ soit d'homogénat (H), soit de surnageant (S), soit de résidu (R) resuspendu ; en outre ClNH₄ 0,008 m, acide glutamique 0,026 m, ATP 0,001 m, SO₄Mg 0,0026 m. Incubation pendant 30 min., à p_H 6,8 et à 38°.

Fractions	Glutamine formée μ m/cm ³ essai
H	5,5
S	0,8
R	1,4
S + R	5,2

Nous voyons par là que nous avons à faire à un système enzymatique complexe: car même la somme des activités individuelles du surnageant et du résidu ne donne pas la valeur obtenue avec l'homogénat complet ; l'un des composants actifs reste donc dans le surnageant (enzyme soluble), tandis que l'autre est sédimenté avec le résidu (système enzymatique insoluble).

Action des mitochondries

En préparant une suspension de mitochondries par centrifugations fractionnées et lavages au ClK et au mannitol selon Leuthardt et Müller (58), nous avons trouvé que ces granules étaient responsables de l'activité du résidu. Naturellement que les mitochondries seules ne possèdent qu'une activité restreinte, laquelle leur est d'ailleurs enlevée par un lavage plus poussé. Le tableau III nous montre l'effet d'une telle suspension de mitochondries, seule et ajoutée au surnageant du même homogénat.

TABLEAU III

Effet des mitochondries et du surnageant d'un même homogénat. - Homogénat à 12,5 % dans ClK isotonique. Dans tous les essais : ClNH_4 0,008 m, acide glutamique 0,026 m, ATP 0,001 m, SO_4Mg 0,0026 m. Incubation pendant 30 min., à pH 6,8 et à 38° .

Fractions *	cm^3/cm^3 essai	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
H	0,25	6,0
S	0,25	0,9
M	0,125	1,0
S + M	0,25 + 0,125	6,5

*) Dans toutes les expériences : H = homogénat, S = surnageant, R = résidu, M = mitochondries.

Nous avons également remarqué qu'il existe une concentration optimale de mitochondries, c'est à dire qu'un excès de celles-ci diminue le rendement en glutamine formée (tableau V). Nous avons peut-être à faire ici à la glutaminase I de Errera et Greenstein (22, 23) activée par les phosphates inorganiques, hydrolysant au fur et à mesure la glutamine formée; ces auteurs ont en effet trouvé une glutaminase liée à des particules insolubles de l'homogénat de foie de rat centrifugé. Il faut ajouter que le pH optimum de cette glutaminase réside vers 8 et que nous travaillons vers 7, ce qui expliquerait qu'il faut une quantité de mitochondries suffisamment élevée pour observer une hydrolyse de la glutamine. Nous avons pu remarquer une action analogue de l'homogénat complet où il existe en plus la glutaminase II de Greenstein (34), soluble, activée par le pyruvate ou d'autres α -cétoacides toujours présents en petites quantités ou provenant

de la transformation d'autres composés tels que l'acide glutamique et l'acide aspartique (p_H optimum 7). Nous avons donc dans l'homogénat les deux glutaminases que nous venons de citer. Le tableau IV nous montre la synthèse enzymatique de la glutamine en fonction de la concentration de l'homogénat.

TABLEAU IV

Synthèse de la glutamine en fonction de la concentration de l'homogénat. (25 % dans ClK isotonique). - Dans tous les essais $ClNH_4$ 0,008 m, acide glutamique 0,026 m, ATP 0,001 m, SO_4Mg 0,0026 m; Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à p_H 6,8.

Homogénat cm^3/cm^3 essai	Glutamine formée $\mu m/cm^3$ essai
0	0,1
0,05	2,8
0,125	5,6
0,250	4,6
0,375	2,8
0,5	2,2

Action du surnageant

Le surnageant dialysé ne perdant pas son activité, nous pouvons admettre qu'il n'existe dans celui-ci aucun co-facteur de faible poids moléculaire en dehors de ceux que nous ajoutons aux substrats, qui puisse avoir une importance dans notre système (tableau VI). Nous pouvons voir d'après la même expérience que le surnageant reste actif, à 0° , pendant au moins 18 heures.

Nous avons en outre soumis le surnageant à une centrifugation plus poussée, c'est à dire à 25.000 g, afin d'éliminer une partie des microsomes; ce second surnageant ainsi obtenu, absolument limpide, légèrement rosé, est aussi actif que le premier, comme le montre le tableau VII. Ceci prouve que nous avons à faire à un ferment soluble.

Nous avons également contrôlé la synthèse de la glutamine en faisant incuber les substrats avec un surnageant d'homogénat centrifugé de foie de rat et avec une suspension de mitochondries de foie de cobaye, et vice-versa. Le tableau VIII nous montre que la réaction est encore possible. Nous verrons par la suite que

TABLEAU V

Synthèse de la glutamine en fonction de la concentration du surnageant et des mitochondries. Homogénat 12,5 % dans ClK isotonique ; dans tous les essais : ClNH_4 0,008 m, acide glutamique 0,026 m, ATP 0,001 m, SO_4Mg 0,0026 m ; Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à pH 6,8.

H	S cm^3/cm^3 essai	M	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
0,25	-	-	4,8
-	0,125	0,25	3,0
-	0,125	0,375	2,4
-	0,25	-	1,0
-	0,25	0,125	5,4
-	0,25	0,25	2,3
-	0,375	0,125	6,8
-	-	0,25	1,0

celle-ci a aussi lieu avec des mitochondries de foie de rat et des extraits de poudres acétoniques de cerveaux de veau ou de mouton. Nous voyons donc qu'il n'y a aucune spécificité dans l'action conjuguée des mitochondries et d'un extrait quelconque.

TABLEAU VI

Synthèse de la glutamine en présence de surnageant dialysé. - Dans tous les essais : ClNH_4 0,008 m, acide glutamique 0,026 m, ATP 0,001 m, SO_4Mg 0,0026 m ; Incubation pendant 30 minutes à 38° et à pH 6,8. S_d = surnageant dialysé pendant 18 heures à 0° contre du ClK isotonique ; S = même surnageant non dialysé, laissé pendant le même temps à la même température que S_d .

S	S_d cm^3/cm^3 essai	M	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
0,25	-	0,125	4,2
0,375	-	0,125	4,7
-	0,25	0,125	4,4
-	0,375	0,125	4,6

Précipitations acides des protéines du surnageant.

Notre enzyme peut être précipité dans le surnageant à l'aide d'un tampon acétate selon Elliot (19, 20). A cet effet, nous avons additionné au surnageant (obtenu après centrifugation à 1500 g) 1/5 de volume d'un tampon acétate 0,1 m de pH 4,2 à environ 0°. Le précipité centrifugé fut repris dans le volume initial, prudemment neutralisé, et recentrifugé. L'activité de cet extrait E_1 par rapport à l'azote protéique est environ trois fois plus forte que pour l'homogénat (tableau IX).

TABLEAU VII

Activité d'un surnageant d'homogénat de foie de rat soumis à une seconde centrifugation de 25.000 g ("Multispeed"). - Dans tous les essais : ClNH_4 0,008 m, acide glutamique 0,026 m, ATP 0,001 m, SO_4Mg 0,0026 m ; incubation pendant 30 minutes, à 38° et à pH 6,8. S_I = surnageant de la première centrifugation (1500 g) ; S_{II} surnageant obtenu par centrifugation de S_I à 25.000 g et R le résidu de cette centrifugation, repris dans le même volume initial.

H	S_I	S_{II} cm ³ /cm ³ essai	R	M	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
0,25	-	-	-	-	6,4
-	0,25	-	-	0,125	7,3
-	-	0,25	-	0,125	6,9
-	-	-	0,25	0,125	1,6
-	-	-	-	0,125	0,7

Préparation de poudres acétoniques ou alcooliques des protéines actives du surnageant.

Les foies de plusieurs rats furent homogénéisés à 20 ou 25 % dans du ClK isotonique, soit dans l'appareil de Potter et Elvehjem (75), soit dans un "Turmix", selon les quantités. Une première centrifugation à 1500 g pendant 10 minutes et à froid nous donna une première séparation grossière en surnageant et résidu (mitochondries et autres débris cellulaires). Le premier surnageant, encore très trouble, (lipides et microsomes) est soumis à une deuxième centrifugation à 25.000 g (multispeed) ; au bout de 50 minutes, nous obtînmes une phase aqueuse absolument claire et active (voir tableau X). A ce second surnageant, nous avons ajouté, lentement et au dessous de 0° un volume double d'acétone ou d'éthanol.

La dessiccation du précipité ainsi obtenu nous donna une poudre sèche. Par extraction de celle-ci à 0° avec du ClK isotonique, et après centrifugation, une partie restant insoluble en raison de la dénaturation par les solvants organiques de certaines protéines, nous avons obtenu une solution active.

TABLEAU VIII

Action conjuguée de mitochondries de foie de cobaye et de surnageant de foie de rat et vice-versa. - Dans tous les essais : ClNH_4 0,008 m, acide glutamique 0,026 m, ATP 0,001 m, SO_4Mg 0,0026 m ; incubation pendant 30 minutes, à 38° et à pH 6,8. S_r et M_r , surnageant et mitochondries d'homogénat de foie de rat (12,5 %) ; S_c et M_c , surnageant et mitochondries de foie de cobaye homogénéisé (12,5 %).

S_r	S_c cm^3/cm^3 essai	M_r	M_c	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
0,25	-	0,125	-	6,2
-	0,25	-	0,125	3,5
0,25	-	-	0,125	4,7
-	0,25	0,125	-	4,4
-	-	0,125	-	0,5
-	-	-	0,125	0,5

A un gramme de foie correspondent en moyenne 80 mg de poudre sèche, et 1 mg de celle-ci donne 0,138 mg d'azote protéique. Le tableau X nous montre l'activité de divers extraits de poudres sèches.

En faisant la précipitation acide dans ces extraits de poudres sèches, nous arrivons à une activité par milligramme d'azote protéique beaucoup plus forte (tableau XI). En variant les pH des tampons acétates employés de 3,3 à 5,1, il s'est avéré que les fractions les plus riches en enzyme furent celles précipitées entre des pH de 4,1 à 4,7 ; le point isoélectrique du ferment se trouverait donc entre ces limites.

Comme nous l'avons déjà dit, et ainsi que nous le verrons plus loin, le ferment proprement dit synthétisant la glutamine est soluble et se trouve de ce fait dans les extraits dont nous venons de parler, les mitochondries n'apportant que l'énergie nécessaire à la rephosphorylation oxydative de l'ATP dégradé.

TABLEAU IX

Activité de la fraction du surnageant d'homogénat (12,5 % de foie de rat précipitée avec un tampon acétate (0,2 m) de pH 4,2. - Dans tous les essais : ClNH_4 0,008 m, acide glutamique 0,026 m, ATP 0,001 m, SO_4Mg 0,0026 m. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à pH 6,8. E_i = extrait du précipité avec tampon acétate.

Fractions	Extrait cm^3/cm^3 essai	mg N prot. / cm^3 essai	Glutamine formée	
			$\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	$\mu\text{m}/\text{mg N}^*$
H	0,25	0,995	6,1	6,1
S + M	0,25	0,595	8,0	12,4
S	0,25	0,595	0,6	1,0
E_i + M	0,25	0,270	6,5	21,4
E_i + M	0,375	0,405	7,2	15,9
M	-	-	0,1	-

*) Comme ce sont les activités du surnageant et d'extraits que nous voulons comparer, nous prenons l'activité des mitochondries comme valeur à blanc, celle-ci étant soustraite au préalable aux valeurs par cm^3 d'essai pour le calcul des activités par rapport à l'azote protéique. Nous ne considérons donc pas non plus la teneur en azote protéique des mitochondries. Ceci sera valable pour toutes nos expériences dans lesquelles nous comparerons des extraits, mais nécessitant la présence de mitochondries.

TABLEAU X

Activité d'extraits de poudres acétonique et alcoolique de surnageant d'homogénat de foie de rat centrifugé. - Dans tous les essais : mitochondries $0,125 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, ClNH_4 $0,008 \text{ m}$, acide glutamique $0,026 \text{ m}$, ATP $0,001 \text{ m}$, SO_4Mg $0,0026 \text{ m}$. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à $\text{pH } 6,8$.

Extraits $\gamma \text{ N/cm}^3$ essai	Glutamine formée	
	$\mu\text{m/cm}^3$ essai	$\mu\text{m/mg N}$
a) de poudre acétonique		
0	0,9	-
75,5	1,6	10,0
189,0	3,0	11,3
377,0	5,7	12,9
566,0	7,2	11,2
189,0 (sans mitochondries)	0,9	4,7
b) de poudre alcoolique		
0	0,6	-
294,0	5,6	16,8
440,0	7,4	15,5

En résumé nous pouvons schématiser comme suit le fractionnement de l'homogénat actif de foie de rat :

SCHEMA I

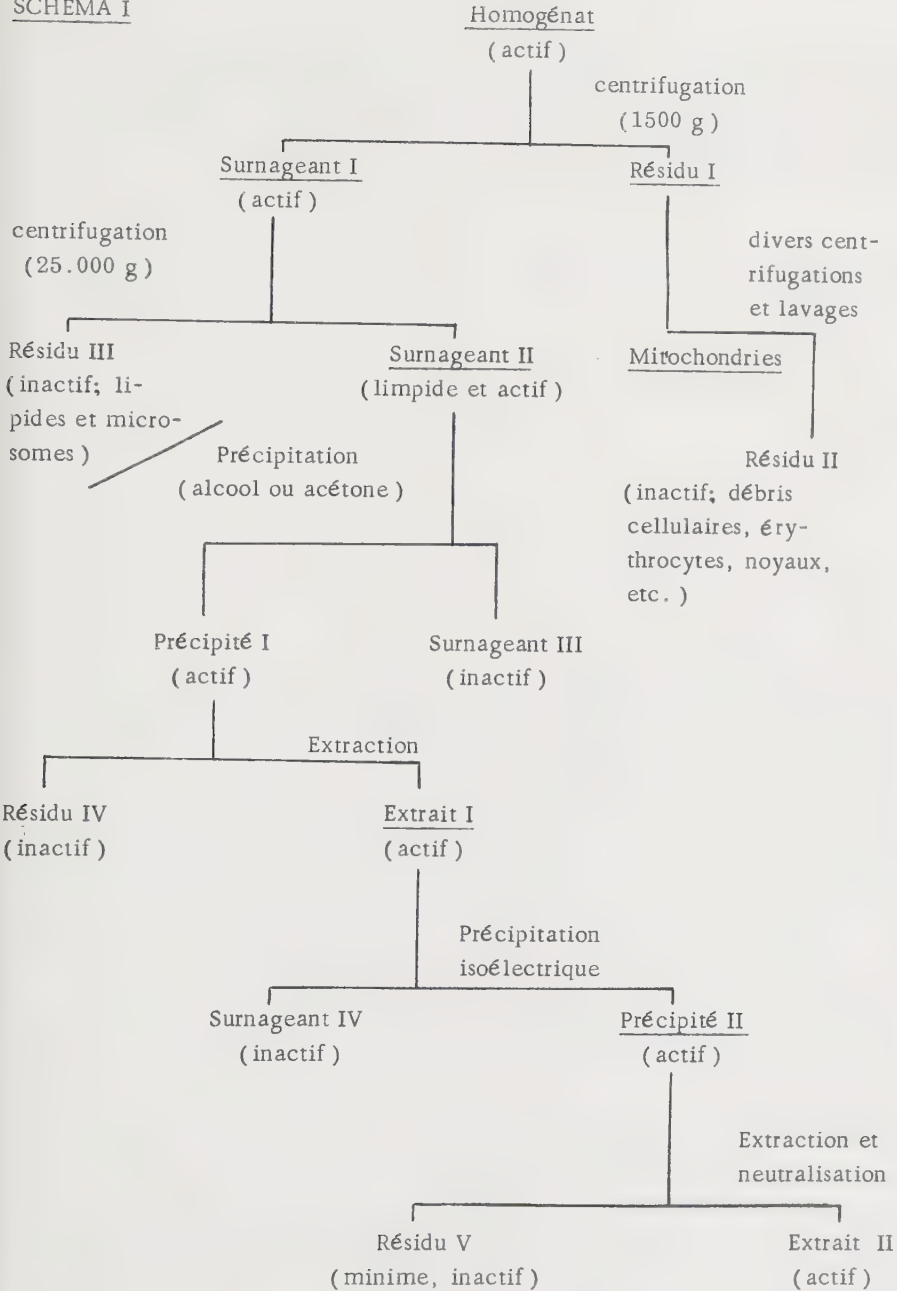


TABLEAU XI

Activité de l'extrait du précipité isoélectrique provenant d'une poudre alcoolique. - Dans tous les essais : mitochondries $0,125 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, CINH_4 $0,008 \text{ m}$, acide glutamique $0,026 \text{ m}$, ATP $0,001 \text{ m}$, SO_4Mg $0,0026 \text{ m}$. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à pH 6,8.

Extraits $\gamma\text{N}/\text{cm}^3$ essai	pH du tampon de précipitation	Glutamine formée	
		$\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	$\mu\text{m}/\text{mg N}$
non précipité			
469	----	7,6	14,3
précipité			
124	4,45	6,1	41,8
104	4,65	5,8	46,8

Activité d'extraits de poudre acétonique de matière grise de cerveaux de mouton ou de veau en présence de mitochondries

Préparation des poudres sèches. - La matière grise de cerveau fut homogénéisée pendant 2 minutes dans un "Turmix" avec 5 à 6 volumes d'acétone et refroidie à -15° . Après avoir laissé reposer durant quelques minutes, nous avons décanté et centrifugé. Le résidu, lavé avec de l'acétone anhydre à 0° , fut filtré, séché tout d'abord à l'air et ensuite sur de l'acide sulfurique, et laissé à environ 0° au vide jusqu'à dessiccation complète. Le tableau XII montre qu'il existe également dans des extraits au CLK isotonique de cette poudre sèche de cerveau un enzyme très actif, synthétisant la glutamine en présence de mitochondries.

Formation de glutamine dans un extrait de surnageant d'homogénat centrifugé de foie de rat sans mitochondries

Nous devons encore prouver que la synthèse proprement dite de la glutamine a bien lieu dans le surnageant de l'homogénat centrifugé et que l'effet obtenu par addition de ce surnageant à des préparations de mitochondries n'était pas une simple activation. En préparant nos poudres acétoniques de matière grise de cerveau, nous avons traité des cellules entières, c'est à dire comprenant les mitochondries; on pourrait admettre que notre enzyme est libéré de ces granules par

TABLEAU XII

Formation de glutamine avec des extraits (5 % dans ClK isotonique) de poudres acétoniques de matière grise de cerveau de mouton et de veau en présence de mitochondries de foie de rat. - Dans tous les essais : ClNH_4 0,008 m, acide glutamique 0,026 m, ATP 0,001 m, SO_4Mg 0,0026 m. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à pH 6,8.

Extraits γ N/cm ³ essai	Glutamine formée	
	μ m/cm ³ essai	μ m/mg N
a) de mouton		
574	8,4	13,1
574 sans mitochondries	1,8	3,1
mitochondries seules	1,0	-
b) de veau		
821	7,9	8,5
mitochondries seules	0,9	-

un phénomène de lyse, ce qui a été montré pour quelques enzymes du cycle tricarboxylique. Speck (88) de son côté fait ses poudres acétoniques de foie de pigeon avec des organes entiers. Dans ce but nous avons préparé un surnageant d'homogénat de foie perfusé (pour éliminer le sang) de rat par centrifugation à 25.000 g. Le surnageant ainsi obtenu était limpide, exempt de mitochondries et ne contenait presque plus de microsomes. La poudre acétonique fut préparée comme décrite plus haut (page 21). Le tableau XIII nous montre que la synthèse enzymatique de la glutamine a réellement lieu dans le surnageant, c'est à dire en présence de la poudre acétonique, et d'une quantité suffisante d'ATP.

Nous pouvons donc affirmer que la formation de la glutamine a lieu dans la phase liquide du protoplasme, et non dans les éléments constitués, du moins en ce qui concerne la cellule hépatique; il est fort probable qu'il en est de même pour les autres organes (reins, cerveau, etc....).

TABLEAU XIII

Synthèse biologique de la glutamine en présence d'un extrait de poudre acétonique de surnageant d'homogénat de foie periusé de rat, sans mitochondries. - Dans tous les essais: ClNH_4 0,010 m, acide glutamique 0,050 m, ATP 0,012 m, SO_4Mg 0,010 m. Incubation à 38° et à pH 7,4.

Extrait (5 % ds. ClK isot.) cm^3/cm^3 essai	Durée de l'incubation minutes	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
0,1	30	3,8
0,1	60	4,9
0,25	30	5,2
0,25	60	7,3

2. Mécanisme de la réaction dans le système complet *).

Inhibiteurs de la formation de la glutamine et action de divers facteurs en système complet.

Les quelques substances étudiées, inhibitrices de la respiration ou du cycle tricarboxylique, inhibent également la synthèse de la glutamine en système complet. C'est à dire que la resynthèse oxydative de l'ATP, comme nous l'avons vu dans la première partie, est bloquée. Les réactions de Borsook et Dubnoff (10) (synthèse de l'arginine à partir de la citrulline) et la synthèse de la citrulline à partir de l'ornithine (Leuthardt et coll. (58, 59, 66, 67), Cohen (13, 14)), dépendant de l'ATP et de la resynthèse de celui-ci, sont également inhibées par certaines substances que nous avons étudiées. Il serait intéressant dans ces conditions d'observer la phosphorylation de l'acide adénosine-5-phosphorique dans les mitochondries (travail de Müller et Leuthardt (66)).

*) Nous appellerons dorénavant système complet, tout système comprenant l'enzyme proprement dit de la synthèse de la glutamine et des mitochondries (nécessaires à la resynthèse de l'ATP), (homogénats, extraits actifs + mitochondries).

Inhibition par le malonate. - Il est connu (10, 78, 79, 92) que le malonate inhibe l'action de la succinodéshydrase, c'est à dire l'oxydation du succinate en fumarate, étape obligatoire du cycle tricarboxylique et du cycle C₄-dicarboxylique de Szent-Györgyi (90). Cette inhibition serait due, d'après ce dernier, vu la parenté de structure avec le succinate, à une affinité compétitive envers la succinodéshydrase, sans pouvoir être pour autant un donateur d'hydrogène. Comme prévu, le malonate inhibe la synthèse biologique de la glutamine en présence de mitochondries ou d'homogénat complet, et le fumarate supprime (partiellement du moins) cet effet inhibiteur, en permettant de sauter la "barrière du malonate" (Frei et Leuthardt (26)), (tableau XIV).

TABLEAU XIV

Inhibition par le malonate et action du fumarate. - A. Homogénat de foie de rat (25 % dans ClK isotonique). Dans tous les essais: ClNH₄ 0,008 m, acide glutamique 0,026 m, ATP 0,001 m, SO₄Mg 0,0026 m. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à p_H 6,8.

Malonate $\mu\text{m/cm}^3$ essai	Fumarate $\mu\text{m/cm}^3$ essai	Glutamine formée $\mu\text{m/cm}^3$ essai
-	-	6,3
10	-	2,0
10	2,5	3,2
-	2,5	5,9

B. Extrait de poudre acétonique de cerveau. Dans tous les essais: mitochondries 0,125 cm³/cm³, ClNH₄ 0,010 m, acide glutamique 0,050 m, ATP 0,001 m, SO₄Mg 0,010 m. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à p_H 6,8.

Malonate $\mu\text{m/cm}^3$ essai	Glutamine formée $\mu\text{m/cm}^3$ essai
-	3,0
10	0,7

Inhibition par le cyanure. - Le cyanure est un inhibiteur de beaucoup d'enzymes du système respiratoire (cytochrome, cytochromeoxydase, catalase, ferment respiratoire de Warburg, etc.) et de ce fait empêche également la resynthèse de l'ATP et la formation de glutamine en système complet (tableau XV).

TABLEAU XV

Inhibition par le cyanure. - Dans tous les essais : extrait de poudre acétonique de cerveau de veau $0,375 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, mitochondries de foie de rat $0,125 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, CINH_4 $0,008 \text{ m}$, acide glutamique $0,026 \text{ m}$, ATP $0,001 \text{ m}$, SO_4Mg $0,0026 \text{ m}$, incubation pendant 10 minutes, à 38° et à pH 6,8.

CNNa $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
-	8,2
10	1,8

Inhibition par le vert de Janus (diméthyl-2,7-phényl-10-amino-3- ((diméthyl-amino) -4'-benzolazo) -6-phénazonium-10-chlorure) et par le violet de cristal (hexaméthyl-p-rosaniline). - Tout comme dans la synthèse de la citrulline (Leuthardt et Müller (58)) le vert de Janus inhibe la formation de glutamine dans un système complet. Il en est de même du violet de cristal. Ces colorants basiques se fixant sur les mitochondries, bloquent les fonctions enzymatiques de ces dernières (tableaux XVI et XVII), (Elliot (19) et Speck (87)).

Action de quelques cations divalents. - Le sublimé, ainsi que le calcium, inhibent presque totalement la synthèse de la glutamine à une concentration de $0,001 \text{ m}$, le manganèse et surtout le zinc à un degré moindre. Le magnésium, par contre, comme nous l'avons d'ailleurs établi dans un autre travail (26) (ainsi que d'autres auteurs), est absolument indispensable dans notre réaction.

TABLEAU XVI

Inhibition par le vert de Janus. - Dans tous les essais: Extrait de poudre acétonique de cerveau de veau $0,25 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, mitochondries $0,125 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, CINH_4 $0,010 \text{ m}$, acide glutamique $0,050 \text{ m}$, SO_4Mg $0,010 \text{ m}$, ATP $0,00025 \text{ m}$. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à pH 6,8.

Vert de Janus $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
-	10,3
0,1	0,7

TABLEAU XVI

Inhibition par le violet de cristal. - Dans tous les essais : extrait de poudre acétonique de cerveau de mouton $0,375 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, mitochondries $0,125 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, ClNH_4 $0,008 \text{ m}$, acide glutamique $0,026 \text{ m}$, ATP $0,001 \text{ m}$, SO_4Mg $0,0026 \text{ m}$. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à pH 6,8.

Violet de cristal $\mu \text{ m/cm}^3$ essai	Glutamine formée $\mu \text{ m/cm}^3$ essai
-	6,7
1,0	2,4

TABLEAU XVIII

Action de quelques cations divalents. - Dans tous les essais : extrait de poudre acétonique de cerveau de veau $0,25 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, mitochondries $0,125 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, ClNH_4 $0,010 \text{ m}$, acide glutamique $0,050 \text{ m}$, ATP $0,00025 \text{ m}$. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à pH 6,8.

	Cations divalents $\mu \text{ m/cm}^3$ essai	SO_4Mg $\mu \text{ m/cm}^3$ essai	Glutamine formée $\mu \text{ m/cm}^3$ essai
Cl_2Hg	-	10,0	10,3
	1,0	10,0	0,5
	10,0	10,0	0,5
Cl_2Ca	-	10,0	6,2
	1,0	10,0	0,3
SO_4Mn	-	10,0	9,1
	10,0	10,0	2,3
	10,0	-	2,0
SO_4Zn	-	10,0	9,1
	10,0	10,0	7,3
	10,0	-	2,7

Action du monofluoracétate et du monojodacétate. - L'inhibition par le fluoracétate porte sur le cycle tricarboxylique au niveau de l'aconitase avec accumulation de citrate (Peters (74 bis)). Peters (74 bis) admet la formation d'un acide fluorotricarboxylique ; c'est ce composé qui inhiberait l'aconitase, mais il est sans effet sur l'isocitricodéhydrogénase. L'effet du fluorobutyrate serait identique. L'inhibition est surtout forte dans le rein et le coeur, mais elle est faible ou nulle dans le foie et le sang ; en effet, nous n'obtenons qu'une très faible diminution de la formation de glutamine en système complet avec mitochondries de foie de rat en présence de monofluoracétate (tableau XIX).

TABLEAU XIX

Inhibition par le monofluoracétate. - Dans tous les essais : extrait de poudre acétonique de cerveau de veau $0,25 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, mitochondries $0,125 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, ClNH_4 $0,010 \text{ m}$, acide glutamique $0,050 \text{ m}$, ATP $0,00025 \text{ m}$, SO_4Mg $0,010 \text{ m}$. Incubation pendant 30 minutes à 38° et à pH 6,8.

Monofluoracétate $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
-	7,5
1,0	6,9
10,0	4,8

Le monojodacétate, par contre, inhibiteur des enzymes à groupes -SH diminue très fortement la synthèse de notre amide (tableau XX) ; il inhibe également, comme nous le verrons plus loin, la formation de glutamine dans le système sans mitochondries.

TABLEAU XX

Inhibition par le monojodacétate. - Dans tous les essais : extrait de poudre acétonique de cerveau de veau $0,125 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, mitochondries $0,125 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, ClNH_4 $0,010 \text{ m}$, acide glutamique $0,050 \text{ m}$, ATP $0,001 \text{ m}$, SO_4Mg $0,010 \text{ m}$. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à pH 6,8.

Monojodacétate $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
-	2,6
100,0	0,4

Action du fluorure. - Le fluorure (tableau XXI) inhibe dans les deux cas, c'est à dire en système complet et en système sans mitochondries, comme d'ailleurs dans beaucoup de réactions enzymatiques nécessitant la présence de magnésium.

TABLEAU XXI

Inhibition par le fluorure. - Dans tous les essais : extrait de poudre acétonique de cerveau de veau 0,25 cm³/cm³, mitochondries 0,125 cm³/cm³, ClNH₄ 0,010 m, acide glutamique 0,050 m, ATP 0,00025 m, SO₄Mg 0,010 m. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à p_H 6,8.

Fluorure $\mu\text{m/cm}^3$ essai	Glutamine formée $\mu\text{m/cm}^3$ essai
-	9,1
1,25	1,6
12,5	0,9
62,5	0,4

Synthèse enzymatique de la glutamine dans un système complet en présence, soit d'acide adénylique-5-phosphorique (AMP), soit d'acide adénosine diphosphorique (ADP), soit d'acide adénosine triphosphorique (ATP).

Nous avons dit dans la première partie (pages 11 et 12) que l'ATP nécessaire à la formation de la glutamine, à partir d'acide glutamique et de sels d'ammonium, dans un système complet (homogénat ou extrait actif et mitochondries), était resynthétisé continuellement au fur et à mesure de sa dégradation. On peut donc admettre que la quantité de ce triphosphonucléotide indispensable à notre réaction peut être notablement abaissée. L'expérience résumée par le tableau XXII nous montre en effet que l'ATP est, dans ce système, un cofacteur agissant en quantité très petite; dans un système dépourvu d'ATP'ase sa teneur pourrait encore être diminuée. Un excès d'ATP semble même inhiber la réaction. Ceci est à l'encontre de ce que nous verrons plus loin, où avec des extraits purifiés, débarrassés d'ATP'ase, agissant sans mitochondries, la glutamine formée dépend de la quantité d'ATP présent, et même stoechiométriquement de la quantité d'ATP utilisée. Dans les conditions tenant compte de la resynthèse oxydative de l'ATP, on doit pouvoir remplacer celui-ci par l'AMP ou l'ADP. C'est en effet le cas; mais la réaction est alors un peu plus lente (tableau XXIII). Nous avons donc pu établir un parallèle avec les expériences de Müller et Leuthardt (66)

TABLEAU XXII

Synthèse de la glutamine en fonction de la concentration en ATP dans un système complet. - Dans tous les essais : extrait de poudre acétonique de cerveau de veau 0,25 cm³/cm³, mitochondries 0,125 cm³/cm³, ClNH₄ 0,010 m, acide glutamique 0,050 m, SO₄Mg 0,010 m. Incubation pendant 30 minutes, à 38°, et à p_H 6,8.

ATP $\mu\text{m/cm}^3$ essai	Glutamine formée $\mu\text{m/cm}^3$ essai
-	2,2 *
0,25	10,0
0,5	10,2
0,75	10,1
1,0	10,3
2,0	7,5

*) La faible synthèse de glutamine dans un milieu non additionné d' ATP est due à des traces, soit d' AMP, soit d' ADP ou d' ATP, toujours présentes dans un système complet frais (Albaum (1) et Green et coll. (32)).

démontrant, dans les mitochondries, la phosphorylation oxydative de l' acide adénosine-5-phosphorique en ATP. Comme nous ne travaillons pas dans les mêmes conditions que ces auteurs (animaux nourris différemment, p_H vers 7,2, phase gazeuse : oxygène 95 % et CO₂ 5 % au lieu d' air), on peut aisément expliquer la différence quantitative de l' action de ces trois phosphonucléotides ; ceci n' infirme d' ailleurs en rien ce que nous voulons prouver.

3. Preuve de la synthèse biologique de la glutamine par la chromatographie sur papier.

Il est évidemment intéressant d' avancer à cette place une autre preuve de la synthèse enzymatique de la glutamine : celle par chromatographie sur papier selon Dent (17). A noter qu' Oerström (74) et Elliot (20) ont réussi à isoler la glutamine formée ; Elliot (20) a soumis à la chromatographie sur papier le produit obtenu et a trouvé de la glutamine en présence de faible quantité d' acide glutamique. Nous n' avons pas isolé l' amide, mais avons traité directement notre milieu d' incubation abituel selon Awapara (5) (déprotéinisation par

TABLEAU XXIII

a) Synthèse de la glutamine en présence d'AMP et d'ATP en système complet. - Dans tous les essais : extrait de poudre acétonique de cerveau de veau $0,35 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, mitochondries $0,125 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, ClNH_4 $0,010 \text{ m}$, acide glutamique $0,050 \text{ m}$, SO_4Mg $0,010 \text{ m}$. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à $\text{pH } 6,8$.

AMP $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	ATP	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
-	-	1,5
1,0	-	4,4
-	1,0	10,3

b) En présence d'ADP et d'ATP. - Mêmes conditions que dans l'expérience avec AMP, sauf la concentration de l'extrait : $0,25 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$.

ADP $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	ATP	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
-	-	0,5
0,02	-	0,9
0,25	0,015 *	5,1
1,0	0,060	6,7
-	0,020 *	0,8
-	0,25	8,1
-	1,0	8,1

*) Les traces d'ATP, présentes en tant qu'impureté dans l'ADP, ne peuvent provoquer une synthèse suffisante.

l'alcool et extraction de ce dernier à l'aide de chloroforme, les acides aminés restant dans la phase aqueuse). Comme système enzymatique nous avons employé un extrait de poudre acétonique de matière grise de cerveau de mouton et des mitochondries ; les composants habituels étaient : ClNH_4 $0,010 \text{ m}$, acide glutamique $0,050 \text{ m}$, SO_4Mg $0,010 \text{ m}$ et ATP $0,001 \text{ m}$. Le rendement en glutamine après 30 minutes d'incubation (à 38° et à $\text{pH } 6,8$) était de $7 \mu\text{m}/\text{cm}^3$. Une partie aliquote correspondant à environ 40% de glutamine ($0,04 \text{ cm}^3$) fut

placée sur la bande de papier Whatman No 1 à l'aide d'une pipette de Hagedorn graduée en $1/1000$ de cm^3 . La chromatographie fut faite dans une seule direction avec une solution aqueuse saturée en phénol ; les acides aminés furent révélés à la ninhydrine. Comme contrôle nous avons utilisé un mélange d'acide glutamique et de glutamine (40 à 50 % de chaque acide aminé), soit seul (I et IV) (Fig. I) soit ajouté sur le papier au milieu d'incubation (II). Les valeurs des R_f dans les chromatogrammes II et III, avec milieu d'incubation, sont plus faibles que dans les contrôles I et IV ("tailing effect" des sels provenant du milieu d'incubation). La chromatographie III est celle du milieu incubé, seul.



Fig. I

I et IV, contrôles : acide glutamique (R_f 0,24) et glutamine (R_f 0,58).

II, contrôle : milieu d'incubation + ac. glutamique (R_f 0,165)
+ glutamine (R_f 0,53)

III, milieu d'incubation seul : R_f 0,165 = acide glutamique
 R_f 0,53 = glutamine

Les deux taches obtenues dans III correspondent bien aux deux taches obtenues dans II (acide glutamique + glutamine, additionnés sur le papier au milieu incubé). Nous avons donc, par chromatographie sur papier, la preuve de la formation de glutamine dans un système complet.

4. Fractionnement d'extraits de matière grise de cerveau.

Pour entreprendre sérieusement la purification de l'enzyme synthétisant la glutamine, un matériel de départ stable, homogène et facile à obtenir en grande quantité, s'imposait. Après quelques tâtonnements, notre choix s'est porté sur la matière grise de cerveau de veau ou de mouton. Comme nous l'avons écrit, les foies de porc, de veau ou de mouton ne présentaient qu'une activité très réduite, du moins dans nos conditions d'expérience. Il faut ajouter que les poudres acétoniques de cerveau gardèrent leur activité pendant plus de deux ans.

Nous avons tout d'abord appliqué le fractionnement que Speck (88) a utilisé pour des poudres acétoniques de foie de pigeon. Le schéma II nous résume ce fractionnement. Nous avons, pour être indépendants de l'adénosine triphosphatase contenue dans quelques extraits, dosé l'activité en présence de mitochondries (tableau XXIV). Nous avons en outre établi l'activité de cette phosphatase dans ces différentes fractions. Les expériences furent faites dans les conditions optimales décrites par Du Bois et Potter (17 bis), en présence de sel de calcium et de tampon véronal de p_H 7,4. Le tableau XXV nous donne les degrés d'hydrolyse du premier phosphate labile de l'ATP en 30 minutes et à 38° ; on remarquera que celle-ci est négligeable pour les extraits III et IV (schéma II). Nous avons constaté que la poudre acétonique semblait perdre cette activité phosphatasique en vieillissant, mais nous n'avons pas approfondi cette question.

Dans ces fractions dépourvues de phosphatase nous avons pu supprimer l'addition de mitochondries et augmenter la concentration en ATP; nous avons ainsi obtenu une relation stoechiométrique entre la glutamine formée et l'ATP utilisé (tableau XXVI). D'autre part, dans ces conditions, le p_H optimum de la synthèse de la glutamine est monté de 6,8 à 7,4 / 7,5 (tableau XXVII) et de plus la présence de cyanure est nécessaire, probablement pour la protection de groupes -SH (tableau XXVIII).

SCHEMA II

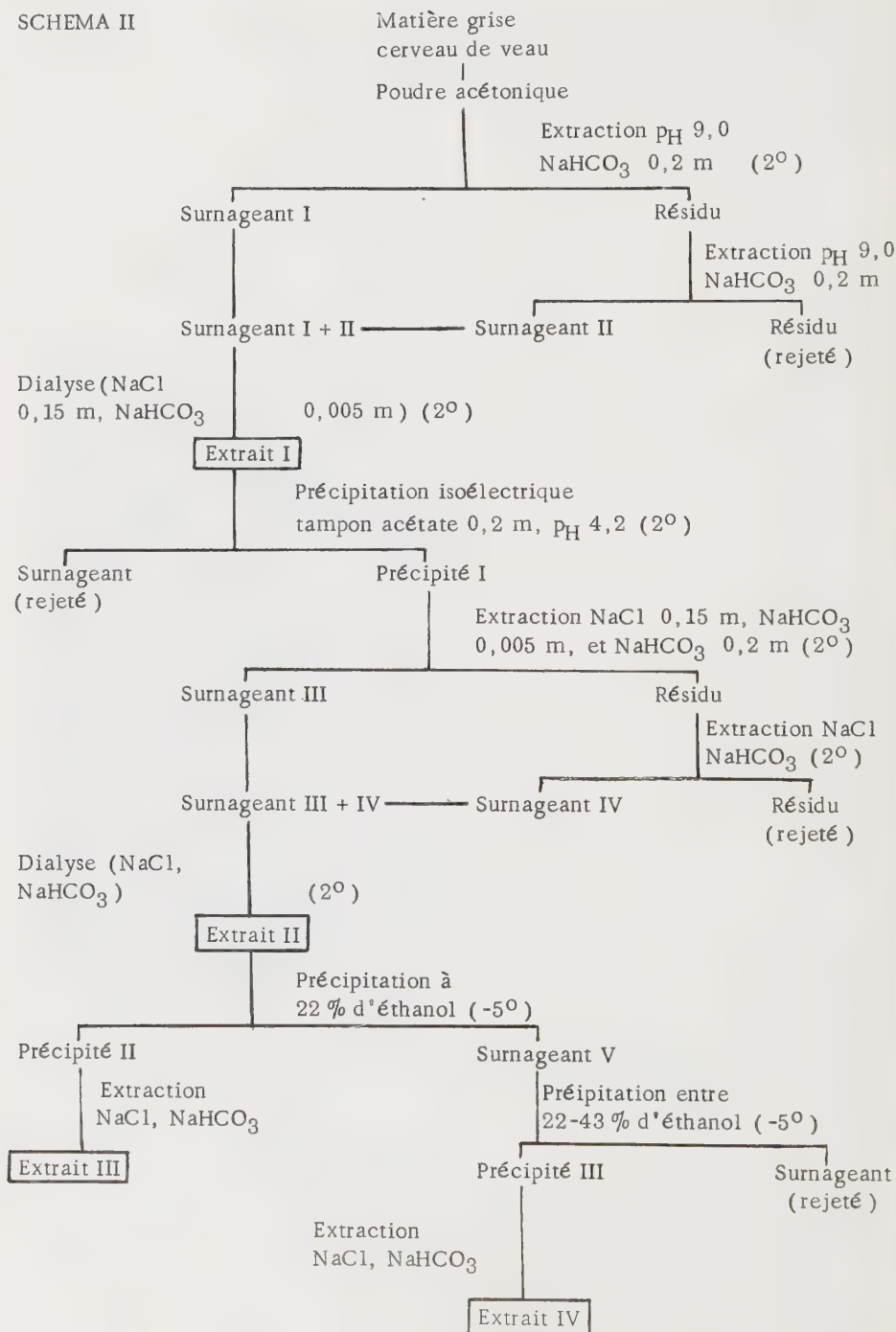


TABLEAU XXIV

Activité de divers extrait de matière grise de cerveau de veau obtenus par le fractionnement selon Speck (88). Dans tous les essais : mitochondries $0,125 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, ClNH_4 $0,010 \text{ m}$, acide glutamique $0,050 \text{ m}$, ATP $0,001 \text{ m}$, SO_4Mg $0,010 \text{ m}$. Incubation pendant 30 minutes, à pH 6,8 et à 38° .

Extrait (v. schéma II)	$\gamma \text{ N/cm}^3$ essai	Glutamine formée	
		$\mu \text{ m/cm}^3$ essai	$\mu \text{ m/mg N}$
I	643	7,6	10,0
II	245	8,3	28,8
III	169	8,2	41,0
IV	19,9	7,2	299,0

TABLEAU XXV

Activité de l'adénosine triphosphatase dans les extraits de matière grise de cerveau de veau obtenus par le fractionnement de Speck (88). - Dans tous les essais : quantité d'extraits correspondant aux expériences habituelles, CaCl_2 $0,003 \text{ m}$, tampon véronal $0,01 \text{ m}$ (pH 7,4). Incubation pendant 30 minutes à 38° .

Extraits (v. schéma II)	ATP $\mu \text{ m/cm}^3$ essai	ATP'ase
		%
I	2	18,7
	4	10,3
II	2	15,4
	4	8,6
III	2	2,9
	4	2,2
IV	2	0,5
	4	0,75

TABLEAU XXVI

Equivalence entre la glutamine formée et l'ATP utilisé. - Dans tous les essais: fraction IV (v. schéma II) $0,075 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, CINH_4 $0,010 \text{ m}$, acide glutamique $0,050 \text{ m}$, SO_4Mg $0,010 \text{ m}$, tampon véronal $0,0116 \text{ m}$, CNNa $0,040 \text{ m}$ (neutralisé). Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à pH $7,4$.

ATP $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	Phosphate inorganique libéré $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
0	0	0
1,5	0,76	0,97
3,0	1,65	1,82
6,0	2,55	2,6
9,0	2,83	2,9

TABLEAU XXVII

Activité en fonction du pH . - Dans tous les essais: fraction III (v. schéma II) $0,075 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, acide glutamique $0,050 \text{ m}$, ATP $0,006 \text{ m}$, SO_4Mg $0,010 \text{ m}$, CNNa $0,040 \text{ m}$, tampon véronal $0,0116 \text{ m}$. Incubation pendant 30 minutes à 38° .

pH	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
6,8	4,2
7,0	4,8
7,2	5,0
7,5	5,1
7,7	4,6
7,9	4,5

TABLEAU XXVIII

Effet du cyanure. - Dans tous les essais : fraction III (v. schéma II) 0,075 cm³/cm³, CINH₄ 0,010 m, acide glutamique 0,050 m, ATP 0,006 m, SO₄Mg 0,010 m, tampon véronal 0,0116 m. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à p_H 7,4.

CNNa μm/cm ³ essai	Glutamine formée μm/cm ³ essai
-	3,1
10,0	3,9
40,0	4,7

Nous n'avons cependant pas réussi à purifier davantage la fraction (IV) la plus active obtenue d'après le fractionnement de Speck (88). Nous avons alors essayé un fractionnement dans l'extrait du précipité isoélectrique (fraction II, schéma II) au sulfate d'ammonium, ainsi qu'avec divers autres sels et à des p_H différents. Aucun enrichissement appréciable n'a été obtenu de cette façon. Par contre en soumettant le même extrait (II) à un fractionnement acétonique, et en traitant la fraction la plus active au n-butanol, nous obtenons une concentration de l'enzyme. A cet effet nous avons soumis l'extrait actif du précipité isoélectrique (extrait II) à une série de précipitations à l'acétone. Celles-ci eurent lieu à environ -5° et à p_H 7,2 ; le solvant organique fut ajouté très lentement avec une agitation mécanique constante. Les précipités obtenus furent centrifugés à 18 000 t/min. ("Multispeed"), extraits avec une solution de ClNa 0,15 m/HCO₃Na 0,005 m, dialysés pendant 16 heures contre la même solution pour éliminer l'acétone, et recentrifugés. L'activité fut alors testée dans les surnageants (fractions V, VI, VII, v. schéma III) ainsi obtenus (tableau XXXIX).

Le surnageant IV, le plus actif, extrait de la fraction obtenue entre -8,5 et 42 % d'acétone, fut alors secoué pendant 30 à 40 secondes avec le même volume de n-butanol à -2° à un p_H de 7,2, puis laissé à lui-même pendant une heure. Après une centrifugation de 30 minutes à 3000 t/minutes nous avons obtenu quatre phases: un résidu, une phase aqueuse, une émulsion et une phase de n-butanol. L'activité entière restait dans la phase aqueuse; celle-ci fut siphonnée et dialysée contre la même solution de ClNa/bicarbonate pendant au moins 24 heures pour éliminer le n-butanol, et centrifugée à nouveau à 18 000 t/min.. Ce surnageant (VIII) était la fraction la plus active que nous ayons obtenue: de 300 à 580 μm de glutamine synthétisée par milligramme d'azote protéique. Par dialyse de cet extrait VIII contre de l'eau distillée, con-

gélation à -30° et sublimation de la glace à un vide de 10^{-4} mm Hg ("freeze drying") nous avons obtenu une poudre sèche, stable pendant plusieurs mois (1 mg protéine = 0,14 mg N ; mg N/mg protéine = 6,77). En dissolvant celle-ci dans une solution saline on retrouve la même activité (fraction VIII').

Nous avons malheureusement dû doser les activités de nos extraits dans des conditions telles que l'enzyme n'était jamais saturé en substrats, c'est à dire que nous n'avons jamais eu une relation linéaire entre l'activité et la quantité d'enzyme utilisée (fig. II). Nous avons bien essayé de diminuer les concentrations d'enzymes, ainsi que le temps de réaction, mais les dosages devenaient alors imprécis, même en dosant le phosphate libéré selon Berenblum et Chain (8) ; augmenter la concentration des substrats était difficile à cause de l'ATP, produit cher et dont il est peu aisé de faire des solutions concentrées. Ces faits nous empêcheront d'établir des bilans de rendement pour les divers fractionnements (activités totales des extraits). Les rendements par milligramme d'azote protéique seraient en réalité, dans des conditions linéaires, plus élevés que ceux que nous pouvons donner.

Le procédé inverse, c'est à dire faire précéder le fractionnement acétonique par le traitement au n-butanol, ne conduit pas à des fractions aussi pures. Nous n'avons guère réussi à mieux concentrer notre enzyme : extraction à l'eau distillée ou avec un tampon acétate. Seule une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium donna une augmentation de l'activité par rapport à l'azote protéique : 710 - 735 μ m/mg N (20 % de sulfate d'ammonium, p_H 6,0) ; mais le dosage de l'azote étant trop douteux (trop peu d'azote protéique pour le dosage) nous ne le retiendrons pas. Nous avons dû constater, que pousser plus avant la purification devenait extrêmement fastidieux : trop de pertes dans les divers fractionnements nous menant à des rendements dérisoires, auraient demandé un matériel de départ par trop considérable. D'autre part, Elliot (20) travaillant sur le même matériel, signalait que l'enzyme devenait moins stable au cours de la purification. Il est fort possible que ce fait nous ait dérangé dans notre fractionnement, quoique différent de celui d'Elliot (20). Avons-nous à faire à une dénaturation ou est-ce que l'hydrolyse d'un groupe prosthétique éventuel serait facilitée ? (Coenzyme A : ?). L'électrophorèse de l'extrait de poudre sèche (VIII') nous révèle encore une assez forte inhomogénéité (en tous les cas 3 fractions (fig. III)).

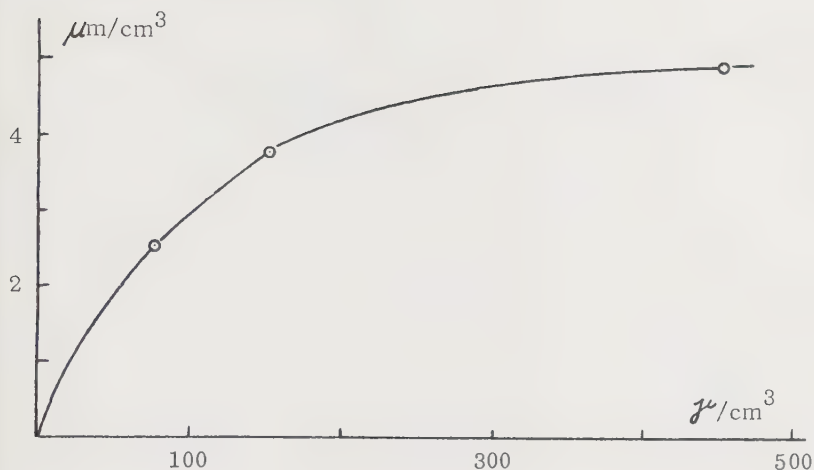
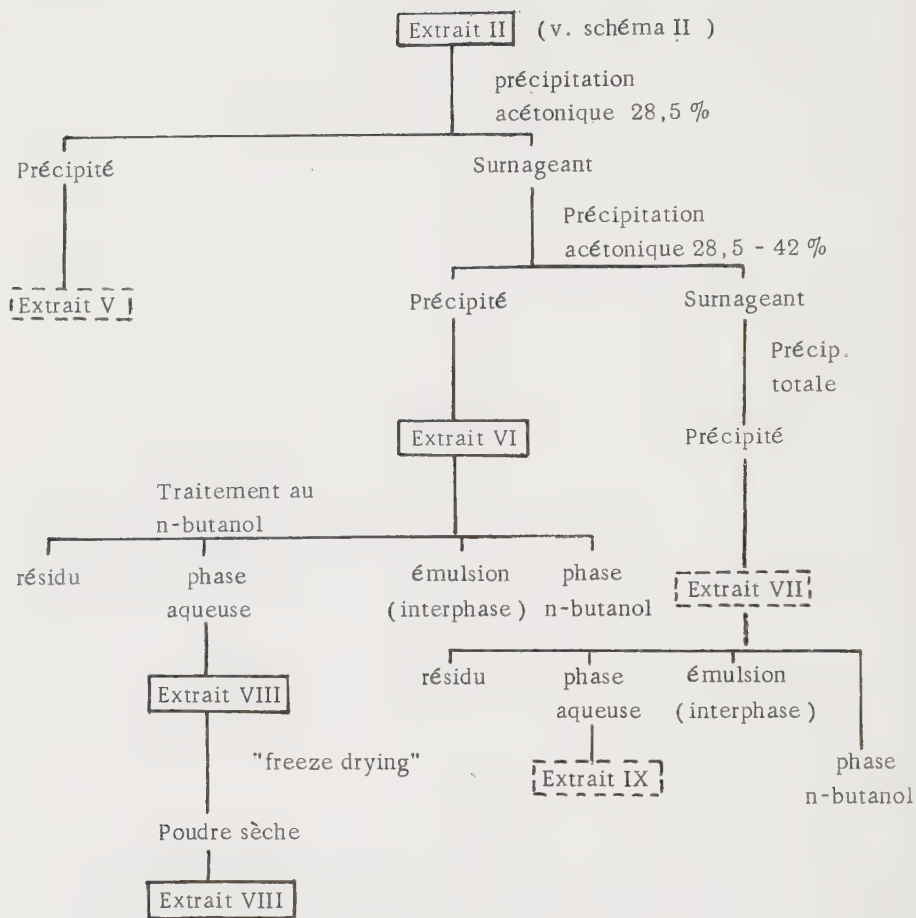


Fig. II

Formation de glutamine en fonction de la concentration d'un extrait purifié (extrait III, schéma II) exempt d'ATP'ase, sans mitochondries. ClNH_4 0,010 m, acide glutamique 0,050 m, ATP 0,006 m, SO_4Mg 0,010 m, CNNa 0,040 m, tampon véronal 0,0116 m. Incubation pendant 45 minutes à 38° et à pH 7,4.

SCHEMA III



La courbe de la figure IV nous montre que pour les durées d'incubation de 30 minutes que nous pratiquons habituellement, la formation de glutamine n'est plus proportionnelle au temps, mais n'a pas encore atteint sa limite.

TABLEAU XXIX

Dosage de l'activité dans les diverses fractions obtenues par précipitations acé-
toniques et traitement au n-butanol. - Dans tous les essais : acide glutamique
0,050 m, ClNH_4 0,010 m, ATP 0,012 m, SO_4Mg 0,010 m. Incubation pen-
dant 30 minutes, à 38° et à pH 7,4.

	Fraction (v. schéma III)	$\mu\text{N}/\text{cm}^3$ essai	Glutamine formée	
			$\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	$\mu\text{m}/\text{mg N}$
Ière série	II	302	4,2	13,9
	V	11	0,5	45,5
		22	1,3	59,1
	VI	25	3,3	132,0
		50	4,5	90,0
	VII	27,5	3,2	112,0
	VIII	13,5	4,1	304,0
		33,7	4,9	146,0
	IX	15,4	1,1	71,5
		38,5	1,5	39,0
II ème série	II	124	5,2	41,0
		249	6,0	24,1
	V	6,2	1,2	195,0
		12,3	1,5	122,0
	VI	57,3	3,2	56,0
		114,5	3,8	33,1
	VII	63,5	0,9	14,2
		127	1,7	13,4
	VIII	7,4	4,3	582,0
		18,2	5,2	286,0
	VIII'	7,4	3,3	447,0
		14,8	5,0	338,0

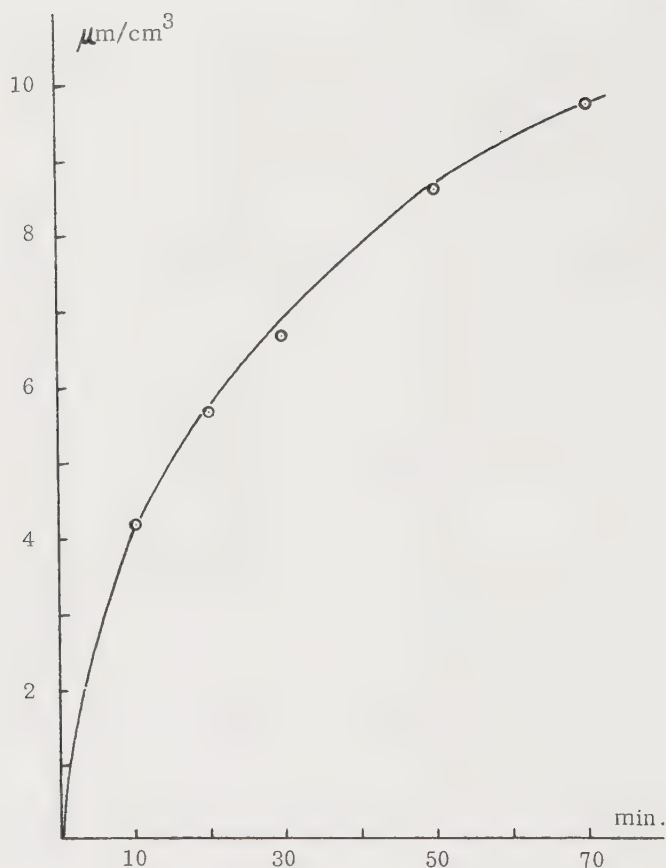


Fig. III

Formation de la glutamine en fonction du temps. - Extrait du précipité alcoolique (22 %) selon Speck (39J N protéique/ cm^3 essai) sans mitochondries ; ClNH_4 0,010 m, acide glutamique 0,050 m, SO_4Mg 0,010 m, ATP 0,012 m, CNNa 0,040 m. Incubation à 38° et pH 7,4.

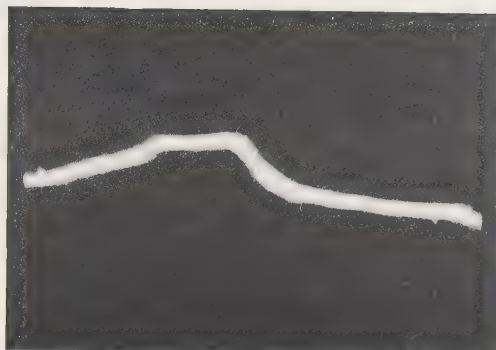


Fig. IV

Microélectrophorèse de l'extrait de poudre sèche ("freeze drying"), fraction VIII' (v. schéma III). Tampon véronal, pH 8,6 ; 30 minutes.

5. Inhibition de la formation de la glutamine et action de divers facteurs dans des systèmes purifiées (sans mitochondries).

Bien des inhibiteurs de la synthèse biologique de la glutamine en système complet (avec mitochondries) ne le sont plus dans les systèmes simples avec extraits purifiés (sans mitochondries). Tels sont le cyanure, le malonate, le fumarate, le pyruvate ; de même Elliot (20) et Speck (88) n'ont pas obtenu d'inhibition avec le violet de cristal ; il s'agit là de substances affectant uniquement la resynthèse de l'ATP. D'autres produits inhibent dans les deux cas ; parmi ceux-ci nous pouvons citer : le monoiodacétate, spécifique pour les groupes-SH (tableau XXX), le fluorure (Speck (88) et Elliot (20)), les ions calcium (Elliot (20)). Une autre catégorie de substances inhibant dans le système simple et non dans le système complet est à mentionner : ce sont tous des nucléotides ; nous avons ainsi la cozymase (DNP), l'acide adénylique (AMP) et l'acide adénosine diphosphorique (ADP). Il s'agit ici d'une compétition entre l'ATP et ces substances, l'enzyme ayant une certaine affinité pour ces nucléotides. Le tableau XXXI nous montre l'effet de l'AMP. L'inhibition par l'ADP a été très bien étudiée par Elliot (20), mais de notre côté nous n'avons pu le démontrer clairement, car nos extraits contenaient encore une myokinase très active (résultats non encore publiés) et catalysant la réaction suivante :

TABLEAU XXX

Inhibition par le monoiodacétate en système simple. - Dans tous les essais : fraction IV (v. schéma II) $0,125 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, ClNH_4 $0,010 \text{ m}$, acide glutamique $0,050 \text{ m}$, ATP $0,006 \text{ m}$, SO_4Mg $0,010 \text{ m}$, CNNa $0,040 \text{ m}$, tampon véronal $0,0116 \text{ m}$. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à pH 7,4.

Monoiodacétate $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
-	3,3
10	2,8 *
100	2,7 *

*) Inhibition assez faible !

TABLEAU XXXI

Action de nucléotides en système simple. - Dans tous les essais : ClNH_4 $0,010 \text{ m}$, acide glutamique $0,050 \text{ m}$, SO_4Mg $0,010 \text{ m}$, CNNa $0,040 \text{ m}$, tampon véronal $0,0116 \text{ m}$. Incubation pendant 30 minutes, à 38° et à pH 7,4.

Fractions cm^3/cm^3 essai	Nucléotides $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	ATP $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	Glutamine formée $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
IV	0,125	AMP	-
			-
			6
			3
			6
III	0,15	ADP	6
			6
			6
			6
			6
IV	0,075	DNP	-
			-
			12
			12
			-
			3,2
			3,2
			4,5
			2,6

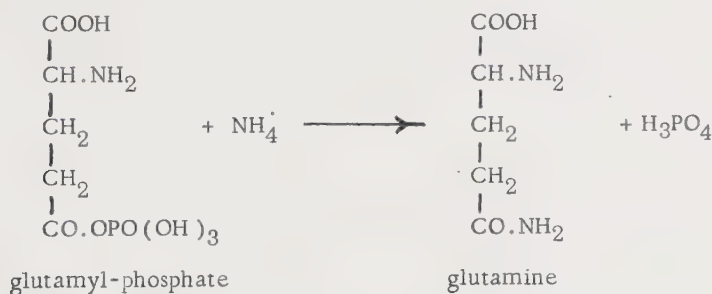
*) Inhibitions assez faibles !

$2\text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$. L'ADP ajouté à l'ATP n'inhibe que très faiblement, et, seul, donne même lieu à une synthèse de glutamine. Par chromatographie sur papier selon Cohn et Carter (15) d'un système incubé avec de l'ATP, au lieu de donner les deux taches dans l'ultraviolet de l'ATP en excès et de l'ADP formé, nous donne à la place de ce dernier celle correspondant à l'AMP.

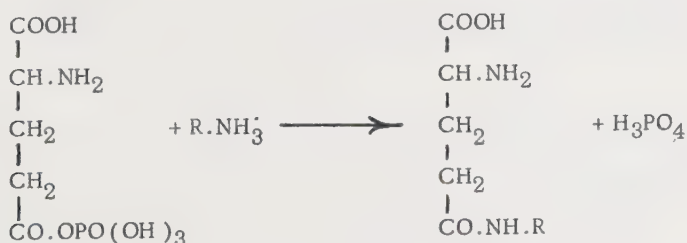
Le magnésium, ainsi que dans le système complet, est nécessaire en système simple ; Speck (88) et Elliot (20) l'ont suffisamment démontré, nous n'y reviendrons pas ; ajoutons simplement que ces deux auteurs ont pu remplacer ce cation bivalent par un autre, le manganèse.

6. Ammonium remplacé par d'autres bases,

Si on examine la réaction :



en remplaçant l'ammonium par d'autres bases (R.NH_2) on obtient :

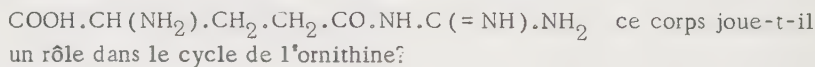


Ainsi l'hydroxylamine, comme l'ont montré Speck (88), Elliot (20) et nous même, donne très facilement l'acide hydroxamique correspondant, dosé selon Lipmann et Tuttle (62). D'après Speck (88) l'hydrazine et la monométhylamine réagissent également très bien, la diméthylamine et les acides aminés très mal ou même pas du tout. Comme cette réaction pourrait avoir une importance dans la synthèse biologique des peptides, cela nous a incité à envisager encore d'autres bases. Il suffit pour cela de doser le phosphate libéré à partir de l'ATP et de travailler avec des extraits dépourvus d'ATP'ase. Speck (88) n'ayant eu aucun résultat avec la glycine et les acides mono-amino-monocarboxoniques, nous avons essayé l'ester éthylique de la glycine et des acides aminés basiques, c'est à dire des bases plus fortes. L'ornithine, l'histidine, l'arginine, la créatine et la glycocyamine, acides aminés typiquement basiques, ainsi que l'histamine, ne réagissent pas. Par contre l'ester de la glycine, la guanidine et l'agmatine réagissent nettement, mais cependant moins que l'hydroxylamine ou l'ammonium. Quelques peptides, tels que la leucyl-glycine et leucyl-glycyl-glycine semblent réagir, quoique très faiblement. Le tableau XXXII nous donne un résumé des expériences tentées dans ce sens. Nous aurions alors la formation des corps suivants pour :

a) l'ester de la glycine



b) la guanidine



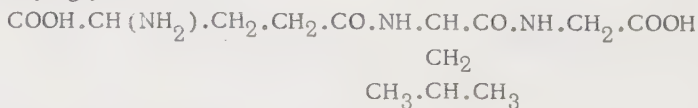
c) l'agmatine



ou



d) la leucyl-glycine



e) la leucyl-glycyl-glycine

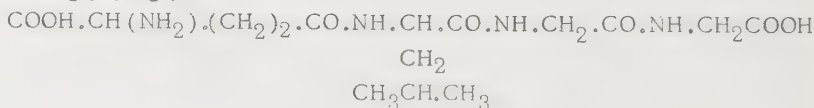


TABLEAU XXXII

Formation de divers glutamyl-dérivés. - Dans tous les essais : fraction II (v. schéma II) $0,25 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, acide glutamique $0,050 \text{ m}$, SO_4Mg $0,010 \text{ m}$, CNaNa $0,040 \text{ m}$, Tampon tris-(hydroxy-méthyl)-aminométhane $0,1 \text{ m}$. Incubation à 38° et pH 7,0.

Base $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	ATP $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai	durée incubation heures	Phosphate inorganique libéré $\mu\text{m}/\text{cm}^3$ essai
Hydroxylamine			
50	6	1	5,7
50	12	3	12,4
Ester glycine			
20	6	1	0,4
20	12	3	1,4
100	12	3 15	3,6
100	12	3	3,2
Guanidine			
20	6	1	3,1
20	12	3	3,2
Agmatine			
20	12	3	4,4
Arginine			
20	12	3	-
Créatine			
20	12	3	-
Glycocyamine			
20	12	3	-
Ornithine			
20	6	1	-
Histidine			
20	3	1	-

TABLEAU XXXII (suite)

Base $\mu\text{m/cm}^3$ essai	ATP $\mu\text{m/cm}^3$ essai	durée incubation heures	Phosphate inorganique libéré $\mu\text{m/cm}^3$ essai
Histamine 20	6	1	-
Leucyl-glycine 100	12	3 15	0,7
Leucyl-glycyl- glycine 100	12	3 15	0,2
Glycyl-leucine 100	12	3 15	-
Leucyl-tyrosine 100	12	3 15	-

Il serait bon maintenant de montrer la formation de ces glutamyldérivés par la chromatographie sur papier, ceci n'est malheureusement pas possible dans nos conditions d'expérience, vu le grand excès des bases employées et la faible synthèse de ces dérivés. Seules les formations de glutamine et d'acide glutamylhydroxamique (en système simple ; en système complet v. fig. I) ont pu être révélées par cette méthode (Fig. V).

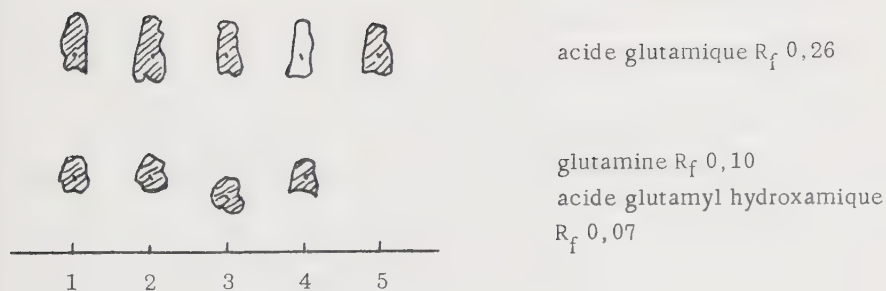


Fig. V

Chromatographie de milieux incubés avec NH_4^+ ou NH_2OH , acide glutamique, ATP et SO_4Mg . Système sans mitochondries. Démonstration de la formation de glutamine et d'acide glutamyl hydroxamique. Solvants : butanol, acide formique, eau; papier Whatman No 1; méthode ascendante.

- 1 milieu incubé avec NH_4^+
- 2 comme 1, mais glutamine ajoutée au "spot" en tant qu'entraîneur
- 3 incubé avec NH_2OH
- 4 glutamine chromatographiée dans les mêmes conditions que le milieu incubé
- 5 milieu incubé sans NH_4^+ ni NH_2OH , mais avec acide glutamique

CONCLUSIONS

D'après ce que nous venons de constater, ainsi que ce qui ressort d'autres travaux, nous devons envisager le rôle du système acide glutamique - glutamine sous plusieurs angles, différents en apparence, mais en étroite relation.

Tout d'abord, comme nous en avons déjà discuté, la glutamine (comme d'ailleurs l'asparagine avec laquelle elle est en équilibre) sert de transporteur de l'ammonium labile non toxique. La glutamine fournit l'ammonium dans l'uréogénèse, en particulier dans la formation de la citrulline, et participe à de nombreux processus de désintoxication (formation de phénacétylglutamine et dérivés, d'acide hippurique, etc...).

Nous avons confirmé la nécessité de la présence des ions Mg^{++} et de l'ATP; ce dernier peut, en système complet, être remplacé par l'AMP ou l'ADP. Nous pouvons admettre sans réserve (quoique n'ayant pu le prouver réellement) la formation intermédiaire de glutamylphosphate. Ce glutamylphosphate réagit avec certaines bases présentes pour donner naissance aux glutamyl-dérivés correspondants. La première réaction est enzymatique; la seconde a probablement lieu spontanément, du moins en ce qui concerne l'hydroxylamine et certainement l'ammonium et les bases fortes. Il est connu que l'hydroxylamine réagit quantitativement avec les acylphosphates. Il se peut que la réaction entre le glutamylphosphate et les bases plus faibles soit une réaction d'équilibre catalysée par un second enzyme, une glutamotransférase. Ceci mériterait d'être étudié avec des systèmes purifiés, c'est à dire formant de la glutamine ou de l'acide hydroxamique et voir s'il y a encore réaction avec des bases plus faibles.

Nous avons vu que la formation de glutamine en présence d'homogénat ou d'un complexe contenant des mitochondries ne nécessite que des quantités catalytiques d'ATP, celui-ci étant reformé au fur et à mesure de son utilisation par phosphorylation oxydative de ses produits de dégradation, acide adénylique et surtout ADP. De ce fait il ressort que le rendement en glutamine est supérieur en système complet à celui avec des extraits purs, difficilement saturable en ATP dans les conditions d'expérience, agissant sans mitochondries. La resynthèse continue de l'ATP remédie en quelque sorte à cette carence.

Tous les inhibiteurs ou facteurs étudiés ont contribué à confirmer certaines hypothèses ; telles les substances agissant en sens contraire si on les fait agir en système complet ou simple. Ainsi le cyanure, le malonate, le violet de cristal et le vert de janus n'inhibent que la resynthèse de l'ATP et non la formation de glutamine. Au contraire l'AMP et l'ADP empêchant sa synthèse en présence d'extraits purs sans mitochondries, par compétition, ne peuvent plus perturber en système complet puisqu'ils sont très rapidement transformés en ATP. D'autres substances sont des inhibiteurs moins spécifiques ; nous avons ainsi le monoiod-acétate, le fluorure, les sels de mercure et de calcium.

La chromatographie sur papier nous a également apporté une preuve à l'appui de la synthèse biologique de la glutamine et de l'acide glutamylhydroxamique.

Est-ce que la glutamine, ou l'enzyme responsable de sa formation, jouent un rôle dans la synthèse des γ -peptides et par combinaison avec des transpeptidases de celle des peptides en général (Hanes et coll. (36)) ? Est-ce là qu'il faut faire intervenir le concept de la glutamo- (asparto-) transférase introduit par Waelsch (98, 99, 100, 101) ? Nous ne pouvons répondre à ces questions dans l'état actuel de nos connaissances.

En ce qui concerne sa synthèse dans l'organisme animal nous pouvons être plus affirmatif. Nous savons que l'enzyme est soluble, se trouve dans le protoplasme et n'est associé à aucune particule, une libération par un artéfact de préparation n'est pas à envisager. Le point isoélectrique de l'enzyme réside autour de 4,5 et représente également son minimum de solubilité ; il est précipitable par la plupart des solvants organiques, par le sulfate d'ammonium ainsi que par divers autres sels, à froid, et sans dénaturation. C'est un ferment relativement stable, il supporte une température d'une quarantaine de degrés pendant plusieurs heures, en milieu stérile, ainsi que la congélation à très basse température, sans aucune perte d'activité. Les poudres sèches se laissent conserver dans un dessiccateur à 0°, sans dénaturation de l'enzyme considéré, pendant plusieurs mois et même années. Il se comporte à l'électrophorèse comme une globuline (nous n'avons pas approfondi l'examen de cette question). La formation biologique de la glutamine semble avoir lieu dans la plupart des organes ; nous l'avons nous mêmes étudiée dans le foie et le rein du rat et du cobaye et dans la matière grise de cerveau de veau et de mouton.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) H. Albaum, Arch. Biochem., 24, 375, (1949)
- 2) R.M. Archibald, J. biol. Chem., 154, 643, (1944)
- 3) R.M. Archibald, Chem. Rev., 37, 161, (1945)
- 4) R.M. Archibald, J. biol. Chem., 154, 657, (1944)
- 5) J. Awapara, Arch. Biochem., 19, 173, (1949)
- 6) S.S. Backulis et A.L. Lehninger, J. biol. Chem., 190, 339, (1951)
- 7) K. Bailey, Biochem. J., 36, 121, (1942)
- 8) I. Berenblum et E. Chain, Biochem. J., 32, 295, (1938)
- 9) M. Bielschowsky, Biochem. J., 47, 105, (1950)
- 10) H. Borsook et J.W. Dubnoff, J. biol. Chem., 141, 717, (1941)
- 11) A.E. Braunstein et M.G. Kritzmman, Enzymol., 2, 129, (1937)
- 12) A.E. Braunstein et M.G. Kritzmman, Adv. Prot. Chem., III, 2, (1947)
- 13) P.P. Cohen et M. Hayano, J. biol. Chem., 166, 251, (1946)
- 14) P.P. Cohen et M. Hayano, J. biol. Chem., 170, 687, (1947)
- 15) W.E. Cohn et C.E. Carter, J. Am. Chem. Soc., 72, 4273, (1950)
- 16) R.J. Cross, J.V. Taggart, G.A. Covo et D.E. Green, J. biol. Chem.,
177, 655, (1949)
- 17) C.E. Dent, Biochem. J. 43, 169, (1948)
- 17a) K.P. DuBois et Van R. Potter, J. biol. Chem., 150, 185, (1943)
- 18) A.L. Dounce, A. Rothstein, G. Beyer, R. Meyer et R.M. Freen, J. biol.
Chem., 174, 361, (1948)
- 19) W.H. Elliot, Nature, 161, 128, (1948)
- 20) W.H. Elliot, Biochem. J. 49, 106, (1951)
- 21) W.H. Elliot, Fed. Proc., 11, 207, (1952)
- 22) M. Errera, J. biol. Chem., 178, 483, (1949)
- 23) M. Errera et J.P. Greenstein, J. biol. Chem., 178, 495, (1949)
- 24) C.H. Fiske et Y. Subbarow, J. biol. Chem., 159, 21, (1945)
- 25) O. Folin et V. Ciocalteu, J. biol. Chem., 73, 627, (1927)
- 26) J. Frei et F. Leuthardt, Helv., 32, 1137, (1949)
- 27) J. Frei et F. Leuthardt, J. suisse Méd., 7, 179, (1950)
- 28) B. Glasson, Thèse, Lausanne (1943)

- 29) G. Gomori, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 62, 33, (1946)
- 30) A.G. Gornall et A. Hunter, J. biol. Chem., 158, 397, (1945)
- 31) D.H. Green, W.F. Loomis et V.H. Auerbach, J. biol. Chem., 172, 389, (1948)
- 32) D.H. Green, W.A. Atchley, J. Nordmann et L.J. Teply, Arch. Biochem., 24, 359, (1949)
- 33) J.P. Greenstein, Adv. Enzymol., 8, 117, (1948)
- 34) J.P. Greenstein et V.E. Price, J. biol. Chem., 178, 695, (1949)
- 35) P.B. Hamilton, J. biol. Chem., 158, 375, (1945)
- 36) C.S. Hanes, F.R.S. Hird, F.J.R. Hird et F.A. Isherwood, Nature, 166, 288, (1950)
- 37) M.M. Harris, J. clin. Invest., 22, 569, (1943)
- 38) G.M. Hogeboom, A. Claude et R.D. Hotchkiss, J. biol. Chem., 165, 615, (1946)
- 39) G.M. Hogeboom, W.C. Schneider et G.E. Pallade, J. biol. Chem. 172, 619, (1948)
- 40) F.E. Hunter et L.F. Leloir, J. biol. Chem., 159, 295, (1945)
- 40a) N.O. Kaplan, Enzymes, II,1, 93, (1951)
- 41) E.P. Kennedy et A.L. Lehninger J. biol. Chem., 179, 957, (1949)
- 42) S.E. Kerr, J. biol. Chem., 139, 121, (1941)
- 43) H.A. Krebs, Biochem. J., 29, 1951, (1935)
- 44) H.A. Krebs, Biochem. J., 36, 758, (1942)
- 45) H.A. Krebs, Biochem. J., 43, 51, (1948)
- 46) H.A. Krebs, Biochem. J., 44, 159, (1949)
- 47) A.L. Lehninger, J. biol. Chem., 161, 438, (1945)
- 48) A.L. Lehninger et E.P. Kennedy, Fed. Proc., 7, 166, (1948)
- 49) G.A. Le Page, ds. W.W. Umbreit, R.H. Burris et J.F. Stauffer, Manometric technics and related methods. Burgess Publ. Comp., Minneapolis (1945)
- 50) F. Leuthardt, Z. physiol. Chem., 252, 238, (1938)
- 51) F. Leuthardt, Biochem. Z., 299, 281, (1938)
- 52) F. Leuthardt, Biochem. Z., 265, 1, (1940)
- 53) F. Leuthardt et B. Glasson, Helv., 25, 630, (1942)
- 54) F. Leuthardt et B. Glasson, Helv. physiol. Acta, 1, 221, (1943)
- 55) F. Leuthardt et B. Glasson, Helv. physiol. Acta, 2, 549, (1944)
- 56) F. Leuthardt et E. Bujard, Helv. med. Acta, 14, 274, (1947)
- 57) F. Leuthardt et E. Bujard, Résultats non publiés.
- 58) F. Leuthardt et A.F. Müller, Exper., 4, 478, (1948)
- 59) F. Leuthardt et A.F. Müller et H. Nielsen, Helv., 32, 744 (1949)

- 60) F. Leuthardt et J. Mauron, *Helv. physiol. Acta*, 8, 387, (1950)
- 61) F. Lipmann, *Adv. Enzymol.*, 1, 99, (1941)
- 62) F. Lipmann et L.C. Tuttle, *J. biol. Chem.*, 159, 21, (1945)
- 63) F. Lipmann, *Fed. Proc.*, 8, 597, (1949)
- 64) F. Lipmann, *Adv. Enzymol.*, 6, 231, (1946)
- 65) A.F. Müller et F. Leuthardt, *Helv.*, 32, 144, (1949)
- 66) A.F. Müller et F. Leuthardt, *Helv.*, 32, 2349, (1949)
- 67) A.F. Müller et F. Leuthardt, *Helv.*, 33, 262 (1950)
- 68) A.F. Müller et F. Leuthardt, *Helv.*, 33, 268, (1950)
- 69) D. Nachmansohn, H.M. John et H. Waelsch, *J. biol. Chem.*, 150, 485, (1943)
- 70) D.M. Needham, *Biochem. J.*, 43, 159, (1948)
- 71) H. Nielsen et F. Leuthardt, *Helv. physiol. Acta*, 7, C 53, (1949)
- 72) P. Oesper, *Arch. Biochem.*, 27, 255, (1950)
- 73) A. Oerström, M. Oerström, H.A. Krebs et L.V. Eggleston, *Biochem. J.*, 33, 990, (1939)
- 74) A. Oerström, M. Oerström, H.A. Krebs et L.V. Eggleston, *Biochem. J.*, 33, 995, (1939)
- 74a) R.A. Peters, Symposium sur le cycle tricarboxylique, IIème Congrès international de Biochimie, Paris 1952, page 64.
- 75) Van R. Potter et C.A. Elvehjem, *J. biol. Chem.*, 114, 495 (1936)
- 76) Van R. Potter et W.C. Schneider, *Fed. Proc.*, 8, 237, (1949)
- 77) B.A. Prescott et H. Waelsch, *J. biol. Chem.*, 167, 855, (1947)
- 78) J.H. Quastel et W.R. Wooldridge, *Biochem. J.*, 22, 689, (1928)
- 79) J.H. Quastel et A.M.M. Wheatley, *Biochem. J.*, 25, 117, (1931)
- 80) W.C. Schneider, *J. biol. Chem.*, 165, 585, (1946)
- 81) W.C. Schneider, A. Claude et G.H. Hogeboom, *J. biol. Chem.*, 172, 451, (1948)
- 82) R. Schoenheimer, S. Ratner et D. Rittenberg, *J. biol. Chem.*, 127, 333, (1939)
- 83) E. Schulze et E. Bosshard, *Landw. Vers. Stat.*, 29, 295, (1883)
- 84) J.A. Shepherd et G. Kalnitsky, *J. biol. Chem.*, 192, 1, (1951)
- 85) A.E. Sobel, A.M. Mayer et S.P. Gottfried, *J. biol. Chem.*, 156, 355, (1944)
- 86) J.F. Speck, *J. biol. Chem.*, 168, 403, (1947)
- 87) J.F. Speck, *J. biol. Chem.*, 179, 1387, (1949)
- 88) J.F. Speck, *J. biol. Chem.*, 179, 1405, (1949)
- 89) J.L. Still, M.V. Buell et D.E. Green, *Arch. Biochem.*, 26, 406, (1950)

- 90) A. Scent-Györgyi, Studies on biological Oxidations, Leipzig 1937.
- 91) H. Thierfelder et C.P. Sherwin, Ber. Physiol., 47, 2630, (1914)
- 92) T. Thunberg, Biochem. Z., 258, 48, (1933)
- 93) H. Tigerman et R. Mac Vicar, J. biol. Chem., 189, 793, (1951)
- 94) D.D. Van Slyke, R.A. Phillips, P.B. Hamilton, R.M. Archibald, P.H. Fitcher et A. Hiller, J. biol. Chem., 150, 481, (1944)
- 95) Vauquelin et P.J. Robiquet, Ann. Chim., 57, 88, (1806)
- 96) H.B. Vickery, G.W. Pucher et H.E. Clark, J. biol. Chem., 109, 39, (1935)
- 97) H.B. Vickery, G.W. Pucher, H.E. Clark, A.C. Chibnall et R.G. Westall, Biochem. J., 29, 2710, (1935)
- 98) H. Waelsch et D. Nachmansohn, Proc. Soc. exp. biol. Med. 54, 336, (1943)
- 99) H. Waelsch et P. Owades, Fed. Proc., 7, 197, (1948)
- 100) H. Waelsch, P. Schwerin et S.P. Bessman, Fed. Proc., 8, 264, (1949)
- 101) H. Waelsch, Fed. Proc., 10, 266, (1951)

CURRICULUM VITAE

de Jörg Frei

Originaire de Hedingen (Ct. de Zurich), né à Zoug le 20 février 1922.

Je suivis l'école primaire en France, à Bellegarde, département de l'Ain, jusqu'au Certificat d'Etudes Primaires que j'obtins en 1935. Je continuai les études secondaires et supérieures au Collège de Genève, qui se terminèrent en 1942 par le Certificat de Maturité Scientifique (Type C). La même année, j'entrai à l'Ecole Polytechnique Fédérale, dans la section de Chimie, dont j'obtins, en 1946, le Diplôme d'Ingénieur Chimiste.

En 1947, je fis un stage de trois mois à la Policlinique Médicale de Berne, auprès de Monsieur le Professeur Hadorn. En septembre de la même année je devins assistant de Monsieur le Professeur Leuthardt, à l'Institut de Chimie Physiologique de l'Université de Zurich, sous la direction duquel je travaillai à la présente thèse. Pendant cette même période, en 1951, je m'immatriculai pour deux semestres à la Faculté de Philosophie II, de l'Université de Zurich.

